



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Actividad antioxidante del té verde nacional como
prototipo de análisis para otros cultivos de clima
tropical húmedo del Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

María Elena RODRIGO ROJAS

ASESOR

Dra. Silvia SUÁREZ CUNZA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rodrigo M. Actividad antioxidante del té verde nacional como prototipo de análisis para otros cultivos de clima tropical húmedo del Perú [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

1. CODIGO ORCID DEL AUTOR:

0000-0002-1555-4036

2. CODIGO ORCID DEL ASESOR:

0000-0001-7848-0102

3. DNI DEL AUTOR:

10080124

4. GRUPO DE INVESTIGACION:

ANURMET

5. INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:

El presente trabajo se realizó en el laboratorio Marino Villavicencio Núñez del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la UNMSM y ha sido parte del proyecto PNIA N° 17153-2016.

6. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN:

Quillabamba (Cusco): se ubica a 1 050 msnm, entre los paralelos 11° 15' 00" y 13° 30' 00" latitud sur y entre los meridianos 71° y 74° longitud oeste – meridiano de Greenwich.
Tingo María (Huánuco): se ubica a 647 msnm, entre las coordenadas geográficas 75° 53' 00" Longitud Oeste y 09° 18' 00" Latitud Sur.

7. AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:

La presente investigación tuvo una duración de 3 años (2016 – 2019)



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América



Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado
Sección Maestría

ACTA DE GRADO DE MAGISTER

En la ciudad de Lima, a los 10 días del mes de diciembre del año dos mil diecinueve siendo las 04:00 pm, bajo la presidencia de la Dra. Doris Virginia Huerta Canales con la asistencia de los Profesores: Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas (Miembro), Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez (Miembro), Mg. Luis Clever Arias Caycho (Miembro) y la Dra. Silvia Suárez Cunza (Asesora); la postulante al Grado de Magister en Bioquímica, Bachiller en Biología, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **"ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL TÉ VERDE NACIONAL COMO PROTOTIPO DE ANÁLISIS PARA OTROS CULTIVOS DE CLIMA TROPICAL HÚMEDO DEL PERÚ"** con el fin de optar el Grado Académico de Magister en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **A EXCELENTE 19**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA** a la postulante **MARÍA ELENA RODRIGO ROJAS**.

Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo las 05:35 pm, se da por concluido el acto académico de sustentación.

Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas
Profesor Principal
Miembro

Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez
Profesor Asociado
Miembro

Mg. Luis Clever Arias Caycho
Profesor Asociado
Miembro

Dra. Silvia Suárez Cunza
Profesor Principal
Asesora

Dra. Doris Virginia Huerta Canales
Profesor Principal
Presidente

El presente trabajo se realizó en el laboratorio Marino Villavicencio Núñez del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la UNMSM y ha sido parte del proyecto PNIA N° 17153-2016.

Dedicatoria:

A mis amados hijos José María y Noah Alberto, quienes son mi orgullo y fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día y así la vida nos depare un futuro mejor.

A mi madre por su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A la memoria de mi padre por su amor y por haberme inculcado valores.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por proteger mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mi madre, quien me enseña a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos.

A mi esposo, por su valiosa paciencia y comprensión en todo el tiempo invertido durante el desarrollo del presente trabajo.

A mi asesora y amiga, la Dra. Silvia Suárez Cunza, por su inmensurable asesoramiento y guía en la realización de la tesis, y por ser un ejemplo constante en mi vida como mujer, hija, madre, esposa y científica.

Al Mg. Percy Núñez por su asesoría y guía en la identificación de plantas del distrito de Quilabamba-Cusco, así como a la Lic. Liz Clarisa Salinas Rojas por su apoyo incondicional en la recolección de plantas de uso tradicional de la zona.

Al Ing. Warren Ríos por su asesoría y guía en la identificación de plantas del distrito de Tingo María – Huánuco, así como al Sr. César Manrique De Lara Vásquez por su acompañamiento y recolección de plantas de uso tradicional de la zona.

INDICE GENERAL

DESCRIPCIÓN	PAG.
Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
INDICE GENERAL	v
Lista de cuadros	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
CAPITULO I: INTRODUCCION	1
1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Justificación teórica	3
1.4 Justificación Práctica	3
1.5 Objetivos	3
1.5.1 Objetivo general	3
1.5.2 Objetivos específicos	4
CAPITULO 2: MARCO TEORICO	5
2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación	5
2.2 Antecedentes de Investigación	6

2.3 Bases teóricas	8
2.3.1. <i>Camellia sinensis</i> (Té)	8
2.3.1.1 Origen	8
2.3.1.2 Variedades de Té	9
2.3.1.3 Elaboración del Té Verde	9
2.3.2 Polifenoles	10
2.3.3 Flavonoides del té verde	11
2.3.4 Modelo experimental de inducción de estrés oxidativo en pez cebra.	13
2.3.5 Estrés oxidativo	14
2.3.6 Radicales libres (RL)	15
2.3.7 Antioxidantes	16
2.4 Marco Conceptual	16
CAPITULO 3: METODOLOGIA	18
3.1 Tipo y diseño de investigación	18
3.2 Unidad de análisis	18
3.3 Selección y traslado de las muestras de hojas	18
3.4 Técnicas de recolección de datos del té verde	19
3.4.1 Obtención del extracto acuoso de té verde y de los cultivos de clima tropical húmedo.	19
3.4.1.1 Lugar de ejecución	19
3.4.1.2 Análisis preliminar del té verde	19
a) Dsecación y molienda de las muestras de té verde	19
b) Obtención del extracto acuoso de té verde	19
3.4.2 Determinación de algunas propiedades fisicoquímicas	20
3.4.2.1 Densidad aparente por gravimetría	20
3.4.2.2 Sólidos solubles por refractometría	20
3.4.3 Ensayos químicos	20
3.4.3.1 Actividad antioxidante in vitro: Antioxidantes	20

a) Capacidad antioxidante total mediante captación del radical catiónico ABTS ^{•+} (Acido 2,2' –azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	20
b) Potencial antioxidante reductor de ión férrico (FRAP)	21
3.4.3.2 Identificación de catequinas (espectrograma en UV-V)	21
3.4.3.3 Actividad antioxidante in vitro: contenido de metabolitos secundarios	22
a) Determinación de polifenoles	22
b) Determinación de flavonoides totales	22
3.4.4 Ensayos biológicos	22
3.4.4.1 Modelo experimental de estrés oxidativo inducido en pez cebra	22
3.4.4.2 Parámetros bioquímicos	22
a) Catalasa (CAT)	22
b) Superóxido dismutasa (SOD)	22
c) Lipoperoxidación (MDA, TBARS)	25
3.5 Técnicas de recolección de datos de los cultivos de clima tropical húmedo proveniente de los departamentos de Cusco (Quillabamba) y Huánuco (Tingo María)	25
3.5.1 Obtención del extracto acuoso de hojas de plantas de clima tropical húmedo.	25
3.5.1.1 Lugar de ejecución	25
3.5.1.2 Análisis preliminar de las hojas de plantas de clima tropical húmedo.	25
a) Dsecación y molienda de las muestras.	25
b) Obtención del extracto acuoso de hojas de plantas provenientes de Cusco y Tingo María	26
3.5.1.3 Actividad antioxidante in vitro:	26
a) Descomposición de peróxido de hidrógeno	26
b) Quelación del ión ferroso (QIF)	27
c) Determinación de polifenoles	27
d) Determinación de flavonoides totales	28
3.5.1.4 Identificación de catequinas (espectrograma en UV-V)	28

3.6 Análisis estadístico de los resultados	28
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Presentación de Resultados	29
4.1 Presentación de Resultados del té verde	29
4.1.1 Evaluación de la capacidad antioxidante y los metabolitos secundarios	30
4.1.2 Actividad Antioxidante In Vivo.	31
4.2 Presentación de Resultados de los extractos de los cultivos de clima tropical húmedo proveniente de los departamentos de Cusco (Quillabamba) y Huánuco (Tingo María)	32
4.3 Espectrograma en UV-V de los 10 extractos acuosos	35
4.4 DISCUSIÓN	36
CAPITULO 5: CONCLUSIONES	44
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES	45
CAPITULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	46
CAPITULO 8: ANEXOS	55

LISTA DE CUADROS

DESCRIPCIÓN	PAG.
<i>Tabla 1.</i> Categorías de los compuestos fenólicos	11
<i>Tabla 2.</i> Principales compuestos fenólicos identificados en el té verde.	12
<i>Tabla 3.</i> Procedencia de las potenciales plantas medicinales de dos zonas tropicales húmedas del Perú.	20
<i>Tabla N°4:</i> Resultados Físico químicos del extracto acuoso de té verde obtenido por infusión.	27
<i>Tabla N°5:</i> Resultados de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios del extracto acuoso de té verde procedente de La Convención, Cusco.	27
<i>Tabla 6.</i> Resultados de la actividad antioxidante in vivo después de la inducción de estrés oxidativo por cobre en un modelo experimental en pez cebra	29
<i>Tabla 7.</i> Diferencia significativa por pares aplicando prueba de Tukey en los parámetros bioquímicos de estrés oxidativo en el modelo experimental en pez cebra	29
<i>Tabla 8:</i> Resultados fisicoquímicos de sólidos solubles y densidad aparente de los extractos de diez plantas procedentes de Cusco y Huánuco	30
<i>Tabla 9.</i> Actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y flavonoides de extractos acuosos de hojas de diez plantas de dos zonas tropicales húmedas de dos regiones del Perú.	31
<i>Tabla 10.</i> Quelación del ión ferroso (QIF), potencial antioxidante reductor de ión férrico (FRAP) y descomposición de peróxido de hidrógeno de dos zonas tropicales húmedas de dos regiones del Perú.	32

LISTA DE FIGURAS

DESCRIPCION	PAG.
<i>Figura N°1:</i> Principales estructuras químicas de Catequinas	12
<i>Figura 2.</i> Barrido espectral UV-V del estándar de catequina (+) y del extracto acuoso de té verde procedente de La Convención, Cusco.	30
<i>Figura 3.</i> Espectrograma de los extractos acuosos de las hojas con aproximación al pico de absorbancia del estándar catequina y té verde.	36

RESUMEN

Introducción: Las catequinas constituyen los flavonoides más abundantes del té verde y son los metabolitos a los que se les atribuye la mayor parte de las propiedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. El objetivo principal fue evaluar la actividad antioxidante del té verde nacional *in vitro* e *in vivo* como prototipo de extracto rico en catequinas para el análisis de diez potenciales cultivos con actividad antioxidante que crecen en clima tropical húmedo del Perú. Las muestras procedieron de los departamentos de Cusco y Huánuco. El extracto acuoso de té verde se preparó por infusión al 0.5%. La capacidad antioxidante *in vitro* se determinó mediante las técnicas de ABTS, FRAP, fenoles totales (FT) y flavonoides (CF). Para la capacidad antioxidante *in vivo*, se usó un modelo de inducción de estrés oxidativo con Cu^{+2} en pez cebra (*Danio rerio*). Se midieron lipoperoxidación (TBARS), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Los extractos acuosos de las 10 plantas fueron preparados al 1%. La capacidad antioxidante *in vitro* fue analizada además de las técnicas usadas para el té verde, la quelación del ión ferroso (QIF) y la descomposición de H_2O_2 . Además, se obtuvo un espectrograma de los 11 extractos usando como referencia a la catequina.

Los resultados del té verde demostraron capacidad antioxidante, TEAC con un valor de $13,4 \pm 0,8$ mg/g, FRAP 1310 ± 50 $\mu\text{mol/g}$, contenido de FT 964, $\pm 54,7$ $\mu\text{mol EAG/g}$ y CF de $160,7 \pm 38,0$ $\mu\text{mol ECQ/g}$. La capacidad antioxidante *in vivo* mostró efectos positivos sobre el estrés oxidativo, disminuyó significativamente ($p < 0,05$) las TBARS frente a la inducción con cobre, $60,3 \pm 13,9$ $\mu\text{mol/g}$ tejido frente a $100,8 \pm 11,9$ $\mu\text{mol/g}$ tejido. También se observó recuperación significativa ($p < 0,05$) en la actividad de la SOD y de la CAT. Respecto a los extractos acuosos de las diez plantas, la mayor capacidad antioxidante fue exhibida por las hojas de mango, en ambos, TEAC y FRAP, también en contenido de FT ($p < 0,05$), seguido del cacao proveniente de Tingo María. Sin embargo, el CF en equivalente a catequina fue mayor significativamente ($p < 0,05$) en las hojas de cacao. La QIF fue mayor significativamente ($p < 0,05$) en el extracto de ishanga seguido de las hojas de cacao de Tingo María, pero en la descomposición de H_2O_2 fueron las hojas de cacao las que mostraron una mayor potencialidad. En conclusión, el té verde nacional tiene capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* y sirve de prototipo como fuente de catequinas. Sobre los 10 extractos analizados, es la hoja de cacao la que mejor expresa su contenido de catequinas con capacidad antioxidante, pero es la hoja de mango la que tiene el mayor contenido de FT y la mayor actividad antioxidante *in vitro*.

Palabras clave: té verde, clima tropical, polifenoles, catequina, antioxidantes, pez cebra.

ABSTRACT

Introduction: Catechins constitute the most abundant flavonoids in green tea and are the metabolites to which most of the antioxidant properties are attributed *in vitro* and *in vivo*. The main objective was to evaluate the antioxidant activity of national green tea *in vitro* and *in vivo* as a prototype of a rich extract in catechins for the analysis of ten potential crops with antioxidant activity that grow in the humid tropical climate of Perú. The samples came from the departments of Cusco and Huánuco. The aqueous extract of green tea was prepared by infusion at 0.5%. The antioxidant capacity *in vitro* was determined by the techniques of ABTS, FRAP, total phenols (TP) and flavonoids (FC). For the antioxidant capacity *in vivo*, an oxidative stress Cu^{+2} -induced model in zebrafish (*Danio rerio*) was used. Lipoperoxidation (TBARS), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. The aqueous extracts of the 10 plants were prepared at 1%. The antioxidant capacity *in vitro* was analyzed in addition to the techniques used for green tea, ferrous ion chelating (FIC) and the decomposition of H_2O_2 . In addition, a spectrogram of the 11 extracts was obtained using the catechin as a reference.

The results of green tea demonstrated antioxidant capacity, TEAC with a value of 13.4 ± 0.8 mg / g, FRAP 1310 ± 50 μmol / g, content of FT 964, ± 54.7 μmol EAG / g and CF of 160.7 ± 38.0 mol ECQ / g. The antioxidant capacity *in vivo* showed positive effects on oxidative stress, significantly decreased ($p < 0.05$) TBARS versus induction with copper, 60.3 ± 13.9 mol / g tissue versus 100.8 ± 11.9 mol / g fabric. Significant recovery ($p < 0.05$) was also observed in the activity of SOD and CAT. Regarding the aqueous extracts of the ten plants, the highest antioxidant capacity was exhibited by mango leaves, in both, TEAC and FRAP, also in FT content ($p < 0.05$), followed by cocoa from Tingo María. However, the CF in catechin equivalent was significantly higher ($p < 0.05$) in cocoa leaves. The QIF was significantly higher ($p < 0.05$) in the ishanga extract followed by the Tingo Maria cocoa leaves, but in the decomposition of H_2O_2 it was the cocoa leaves that showed the greatest potential. In conclusion, national green tea has antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo* and serves as a prototype as a source of catechins. On the 10 extracts analyzed, it is the cocoa leaf that best expresses its catechine content with antioxidant capacity, but it is the mango leaf that has the highest FT content and the highest antioxidant activity *in vitro*.

Keywords: green tea, tropical climate, polyphenols, catechin, antioxidants, zebrafish.

CAPITULO I: INTRODUCCION

1.1 Situación problemática

Las enfermedades no transmisibles (ENT) como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes mellitus tipo 2 y cáncer constituyen problemas de salud pública en países desarrollados y en vías de desarrollo como el nuestro, registrándose más del 75% de muertes. Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018).

Estas patologías de etiología diversa están relacionadas mediante procesos proinflamatorios subclínicos que se propagan por mecanismos oxidativos con participación de radicales libres derivados del oxígeno y el nitrógeno. El organismo humano cuenta con un elaborado sistema de defensa antioxidante tanto a nivel intracelular como extracelular, que sin embargo pueden ser superados por los procesos oxidativos, estableciéndose un estado de estrés oxidativo (Robbins, Cotran, & Kumar, 1987).

El estrés oxidativo puede ser modificado disminuyendo las reacciones prooxidantes o aumentando las reacciones antioxidantes, mediante fuente exógena de antioxidantes, por reacciones directas o vía estimulación de las defensas antioxidantes.

Por otro lado, los recursos naturales de uso tradicional para diversas enfermedades vienen siendo revalorados para nuevas aplicaciones. La base de esta nueva búsqueda está en función de su contenido de metabolitos secundarios, siendo los más estudiados los grupos con funciones oxigenadas como los polifenoles. Una variedad de estudios ha mostrado que este grupo de metabolitos secundarios exhiben propiedades antioxidantes.

En el territorio nacional, con una diversidad geográfica y con una amplia biodiversidad, los estudios sobre los recursos naturales son aún escasos en el campo de los antioxidantes con este potencial antiinflamatorio.

El té verde (*Camelia sinensis*) contiene elevados niveles de polifenoles, principalmente flavonoides derivados de catequina, además de otros metabolitos secundarios (Graham, et al., 1992). Las diversas catequinas han sido relacionadas por su efecto benéfico con la reducción del riesgo de sufrir enfermedades crónicas las patologías cardiovasculares, obesidad, cáncer, diabetes tipo II (Sabu, Thambi, Ramadasan, & Ikuo, 2010)

Según datos de la Organización Mundial de la Alimentación (FAO), el principal productor/exportador del té verde a nivel mundial es China (Chang, 2015). Recientemente el Perú también produce y exporta té verde, aunque a menor escala.

Esta producción nacional carece de estudios científicos sobre las propiedades antioxidantes, y sus efectos contribuirían a un mayor valor agregado en su biocomercio (Moroni, Martínez, Gutiérrez, Ramos, Núñez, Lizárraga, Burga, Tello & Trevejo, 2007) (López, 2014) (Chambi, Abigai, & Coaquira-Mamani, 2019).

Adicionalmente, la diversidad geográfica y la megabiodiversidad en flora permite suponer la existencia de otros recursos naturales vegetales con potenciales características similares en metabolitos secundarios como las catequinas presentes en el té verde, lo que conduce a buscar e identificar otras plantas teniendo como base la zona de cultivo y el conocimiento popular local.

Se requiere como punto de partida, estudios in vitro sobre la capacidad antioxidante del té verde nacional como prototipo para el análisis de otros recursos naturales provenientes de zonas de clima tropical húmedo, como Quillabamba y Tingo María.

1.2 Formulación del problema

¿La actividad antioxidante del té verde nacional servirá como PROTOTIPO de análisis para otros cultivos de clima tropical húmedo del Perú con potencial antioxidante?

1.3 Justificación teórica

La producción nacional de té verde es relativamente reciente, sin embargo, está compitiendo en el mercado internacional. En la literatura internacional, son escasas las referencias del té verde nacional sobre las propiedades antioxidantes y contenido de polifenoles. Esta carencia de información, permitirá el desarrollo de nuevas investigaciones preclínicas a nivel químico y bioquímico; y poder comparar sus propiedades con las que se consumen en el mercado internacional, generando un valor agregado en el biocomercio del té verde nacional.

Disponiendo de información validada para el té verde nacional, el estudio de otras plantas comparables al té, ampliará el uso potencial de otras fuentes naturales potencialmente beneficiosa para las enfermedades no transmisibles (ENT).

1.4 Justificación práctica

El ensayo de la actividad antioxidante del extracto del té verde peruano a través de un estudio químico y bioquímico, permitirá la estandarización del modelo de estrés oxidativo *in vitro* e *in vivo*. La estandarización de un nuevo modelo animal de estrés oxidativo empleando pez cebra es nuevo en nuestro medio, de tal manera que la metodología a seguir pueda ser utilizada para el análisis de las capacidades antioxidantes de otros cultivos nacionales.

A nivel nacional, los datos obtenidos experimentalmente sustentaran su biocomercio en beneficio de los productores, habida cuenta que en nuestro país tenemos extensas zonas de producción y con la ventaja de ser un cultivo permanente.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante del té verde nacional *in vitro* e *in vivo* como prototipo de extracto rico en catequinas para el análisis de diez cultivos de clima tropical húmedo del Perú con potencial antioxidante.

1.5.2 Objetivos específicos

- Determinar el potencial antioxidante *in vitro* y el contenido de fenoles totales del extracto acuoso de *Camellia sinensis* (té verde nacional).
- Analizar la actividad antioxidante *in vivo* del extracto acuoso de té verde, en un modelo biológico de estrés oxidativo inducido.
- Determinar el potencial antioxidante y el contenido de fenoles totales *in vitro* del extracto acuoso de diez cultivos procedentes de zonas de clima tropical húmedo de Tingo María (Huánuco) y Quillabamba (Cusco).

CAPITULO 2: MARCO TEORICO

2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación

El Perú no figura entre los productores mundiales ni regionales de té verde, sin embargo, exporta a Estados Unidos de Norteamérica y Guatemala, como destinos principales. En el país, Cusco es actualmente el principal departamento productor de té, seguido de Huánuco. Existe la necesidad de apoyar con información científica para incrementar su movimiento en los mercados, así, el estudio de sus características antioxidantes y el contenido de catequinas como el flavonoide principal será el inicio de información local y científica. Conociendo la riqueza del territorio nacional, la posibilidad de contar con otros recursos vegetales creará más oportunidades para nuevas fuentes de antioxidantes con contenido de catequina. Teniendo en cuenta que la catequina está asociada positivamente con las ENT, el aporte de nuevos recursos ampliará la oferta nacional en los mercados internacionales. En el plano de la salud, a nivel nacional debe generarse conocimiento que promueva el consumo del té verde, actualmente, el principal consumidor es Chile seguido de Argentina, el Perú es el quinto consumidor de la región (OMS, 2018).

Los estudios que se dirijan a la investigación de los recursos naturales crean posibilidades para que el investigador elabore, diseñe y ejecute proyectos relacionados con la salud y con repercusión en la economía. Existe literatura que permite iniciar o continuar la generación de conocimiento bajo el método científico.

2.2 Antecedentes de investigación

El consumo del té verde está asociado a diversos beneficios para la conservación de la salud. Los reportes muestran que sus beneficios están asociados su capacidad de estimular la termogénesis y la oxidación de las grasas, lo que conllevaría a una reducción en el índice de la masa corporal y en el peso, (Wolfram, Wang, & Thielecke, 2006) (Phung, Baker, Matthews, Lanosa, Thorne & Coleman, 2018)

Pereira, Knor, Velloso & Beltrame (2014), demostraron que los niveles de fenoles totales y flavonoides son muy variables entre las diferentes marcas de bolsas de té y que los té verdes y blancos presentaron mayores niveles de fenoles totales y flavonoides, mostrando mejores resultados para los radicales libres en DPPH y ABTS comparados con los té negros.

La importancia del consumo del té verde se encuentra en los componentes que contiene polifenoles, como galato de galocatequina (GCG), galocatequina (GC), galato de catequina (CG) y catequina (C), y también flavonoides como kaempferol, quercetina y miricetina, la teanina derivada del aminoácido glutamato, los alcaloides con núcleo de xantina, cafeína, teofilina, y teobromina; saponinas, taninos, así como otras 300 sustancias adicionales. Todos ellos presentan relación con las características organolépticas que la hacen atractiva para su consumo en infusiones (Palacio, Ribero & Restrepo, 2013).

Kanwar, Takeen, Mohammad, Huo, Chan & Dou (2012), realizaron una revisión sobre los polifenoles del té y sus aplicaciones en la prevención y tratamiento de los cánceres humanos, encontrando que el más abundante fue el Epigallocatequina-3-galato (EGCG) el cual inhibe el cáncer a nivel molecular, Sin embargo, este compuesto actuaría por diversos mecanismos aun no dilucidados.

Davico, Poletta, Loteste, Scagnetti, Campana, Parma & Simoniello (2012), evaluaron biomarcadores de daño oxidativo, peroxidación lipídica (TBARS) y defensas antioxidantes como catalasa y glutatión reducido en tejido hepático de *Prochilodus lineatus* expuesto in

vivo a cipermetrina. Fue la enzima catalasa la que se mostró más eficaz para la evaluación *in vivo* de los efectos de cipermetrina.

(Leena & Balaraman 2005) estudiaron el tratamiento con cisplatino y la administración de extracto de té verde en animales. Consiguieron restaurar los niveles de creatinina, urea, nitrógeno ureico en sangre (NUS) y ácido úrico sérico en comparación con los animales tratados solo con cisplatino. Además, observaron la restauración de los niveles de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reducido (GSH) y enzimas ligadas a la membrana.

En América, algunas zonas cultivables poseen drenajes pobres debido a la inundación, niveles freáticos altos o aguas superficiales estancadas. Esta inundación puede disminuir el potencial redox, la disponibilidad de nutrientes para las plantas; además inhibir la actividad de enzimas como la β -D-glucosidasa y la fosfatasa, que son necesarios para el ciclo del carbono, fósforo, nitrógeno y azufre y aumenta las concentraciones de etileno (Xing, Wang, Gao, Xu, & Wang, 2012).

En una aplicación de extracto acuoso al 10%, etanol al 20% y metanol al 20%, se encontró que en el extracto de hojas de *Calophyllum brasiliense* “lagarto caspi”, en extracto acuoso, procedente de Iquitos, se evidenció una mayor capacidad antioxidante en el extracto acuoso con 110.56% a 100ug/ml, por encima del ácido ascórbico que resultó en un 97.27%; por otro lado, el extracto metanólico a 50ug/ml, presentó una actividad antioxidante de 99.76% a diferencia del ácido ascórbico de 94.28% (Castañeda, *et al.*, 2008). Además, otras especies medicinales peruanas presentaron alta capacidad antioxidante por el mismo procedimiento, método de DPHH; Castañeda *et al.* (2008), demostraron que en los extractos de hojas de las siguientes especies: *Minthostachys mollis* “muña” alcanzó 92.41% a 50 μ g/mL en extracto acuoso, *Alchornea castaneifolia* “hiporuro” alcanzó 75.96% a 50 μ g/mL en extracto de metanol, *Calophyllum brasiliense* “lagarto” alcanzó 110.56% a 100 μ g/ml en extracto acuoso y *Smallanthus sonchifolius* “yacón” alcanzó 103.19% a 200 μ g/mL.

Sotero, V. E., Silva, L., Merino-Zegarra, C., Maco, M., Dávila, E., Ramírez, W., & García, D. (2011), realizaron estudios sobre estrés oxidativo de plantas nativas del bosque

amazónicos del Perú como *Rolliniana cecropiaefolia* “uvilla”, *Gustavia longifolia* “chopé” y *Euterpe precatoria* “huasaí”, evidenciando una mayor actividad en cáscaras de “chopé” con una IC₅₀ (concentración media inhibitoria) de 63.02 µg/ml 73.30% de actividad inhibitoria en 100 µg/ml de extractos metanólicos, una mayor concentración de compuestos fenólicos totales en pulpa de “huito”; también se determinó que en la pulpa de estas frutas existe una baja concentración de ácido ascórbico resaltando la “anona” con 4,38mg/100g y la “castaña” con 3,33mg/100g. (González & Torres, 2011) presentaron valores similares en “anihuayo” *Plinia clausa* con 7.27mg/100g, en “ungurahui” *Oenocarpus bataua* con 0,81mg/100g, en “macambillo” *Theobroma subincanum* con 5,62 mg/100g y “ubos” *Spondias bombín* con 3,54 mg/100g.

2.3 Bases teóricas

2.3.1. *Camellia sinensis* (Té)

Es un arbusto o árbol pequeño de hoja perenne de la familia de las Ternstroemiaceas o teaceas. Sus hojas verdes alcanzan los 12 cm de longitud, las cuales son de interés para el consumo humano, presentan flores de color blanco o tonalidad crema que cuelgan en peciolo cortos muy olorosos. El árbol del te florece en primavera. De sus flores nacen pequeños frutos capsulares que contienen de una a tres semillas negruzcas. Los frutos del árbol del te suelen desecharse, aunque en algunos lugares se guardan para extraer las propiedades de sus aceites esenciales. La planta puede alcanzar una altura de 3 a 4 m y se podan continuamente durante los tres primeros años para que crezcan a lo ancho entre 1,5 a 2 m de altura facilitando así el trabajo de recolección, (Prat & Ramos, 2009).

2.3.1.1 Origen

Taxonomía:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Ericales
Familia:	Theaceae
Tribu:	Theeae
Género:	Camellia

Especie: *C. sinensis* (L.) Kuntze, 1887

2.3.1.2 Variedades de té

De la misma especie se obtienen los diversos tipos de té, la diferencia está en el grado de fermentación que influye decisivamente en el color y el sabor de cada variedad de té, y es lo que establece los cuatro tipos básicos: te negro, té verde, te rojo y te blanco. Además de estos podemos encontrar el té Oolong, té amarillo y diversos té aromáticos, (Prat & Ramos, 2009).

El té puede plantarse en cualquier parte, por aislada o inaccesible que sea, pero su calidad aumenta con la altitud. Es posible encontrar cultivos de té incluso a 2500 m de altitud. Sin embargo, las mejores condiciones climáticas para el cultivo de té son la temperatura ambiente moderada entre 15 y 30 °C y el clima tropical o subtropical con lluvia abundante y un mínimo de cinco horas de exposición solar. Para su buen crecimiento y desarrollo, la humedad del aire debe oscilar entre el 70 y 90 %, con lluvias abundantes y regulares durante todo el año. Los suelos óptimos son los de pH ácido (4,5 – 5,5) y bien drenados para evitar la putrefacción de las raíces (Dolagaray, 1993).

2.3.1.3 Elaboración del té verde

Existen diversas maneras de obtener el té verde, puede variar según el país y región. Una de las más utilizadas consiste en cosechar las hojas y almacenarlas en un lugar fresco antes de ser procesadas. Para ello, se esterilizan con vapor y se calientan en una batea rotativa con carbón vegetal a una temperatura de 110 – 120 °C para romper las células de las hojas para liberar el jugo y las enzimas de las mismas, que son esparcidos sobre la superficie de las hojas para prevenir la oxidación y las pérdidas de vitamina C con lo que se mantiene el color verde de las hojas. Luego las hojas de té suaves y flexibles se colocan en un rodillo en forma de luna seguidamente son secadas durante 3 a 4 min a 90 °C (horno de aire caliente). El propósito del secado es: reducir el exceso de agua en las hojas de té, así como el volumen y peso de las hojas para su empaquetado, eliminar las bacterias y enzimas de oxidación (oxidasas) que permanecen en las hojas, inhibir la reacción química en las hojas de té para mejorar su calidad, incrementar su fragancia, color y apariencia exterior. Finalmente, las

hojas de té semi-secas terminan de secarse a una temperatura de 80 °C. Cuando el contenido de agua se reduce hasta el 30%, la temperatura de resecado se reduce a 30 °C (este proceso dura de 2 a 3 horas), (Prat & Ramos, 2009).

2.3.2 Polifenoles

Los polifenoles también referidos como fenoles totales, constituyen el grupo más diverso y abundante de los metabolitos secundarios provenientes de plantas, se les encuentra en los diversos componentes de la dieta, son ejemplos, cebolla, brócoli, palillo, arándanos (y otros berries), frutas cítricas, cacao, café y té.

Se han identificado más de 8000 compuestos fenólicos, estructuralmente pueden ser moléculas aromáticas sencillas con uno o más grupos hidroxilo como también puede identificarse moléculas complejas de alto peso molecular. La categorización de los polifenoles puede resumirse en el número de anillos y el número de carbonos oxidados presentes en la estructura (Tabla 1), siendo la catequina, uno de sus principales componentes antioxidantes (Figura N°1).

Tabla 1. Categorías de los compuestos fenólicos

CLASE	ESTRUCTURA
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzoicos	C6 – C1
Ácidos hidroxicinámicos, fenilpropanoides	C6 – C3
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C6 – C2
Xantonas	C6 – C1 – C6
Estilbenos, antraquinonas	C6 – C2 – C6
Flavonoides, isoflavonoides	C6 – C3 – C6
Lignanos, neolignanos	(C6 – C3) ₂
Ligninas	(C6 – C3) _n
Taninos condensados (proantocianidinas o flavolanos)	(C6 – C3 – C6) _n

Fuente. Datos tomados de Morandi et al (2019)

Los fenoles más estudiados por los efectos benéficos o en prevención de enfermedades no transmisibles (ENT) provienen principalmente de los flavonoides (C6 – C3 – C6) y estilbenos (C6 – C2 – C6) y otros polifenoles no flavonoides. Corresponde a estos grupos, el resveratrol (estilbenos), la epigallocatequina-3-galato, quercetina (flavonoides) y los ácidos clorogénicos y curcumina (polifenoles no flavonoides)

Los compuestos fenólicos por las características estructurales tienen relación con la actividad antioxidante, especialmente por la presencia de los grupos hidroxilo cercanos o adyacentes en los anillos aromáticos. Otra acción demostrada in vitro es la capacidad de quelación de metales de transición como el cobre y el hierro, elementos que favorecen las reacciones de formación de especies reactivas del oxígeno (ROS).

En las hojas de té verde se ha identificado que la principal clase de compuestos fenólicos corresponden a la estructura C6 – C3 – C6 que identifica a los flavonoides.

2.3.3 Flavonoides del té verde

Los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos del té verde corresponden principalmente a los flavonoides, pertenecen la mayoría de estos a la subclase de flavanoles. (Tabla 2), este subgrupo responde por el 70% de su contenido de compuestos fenólicos y explica alrededor del 92% de la capacidad antioxidante (Figura 1).

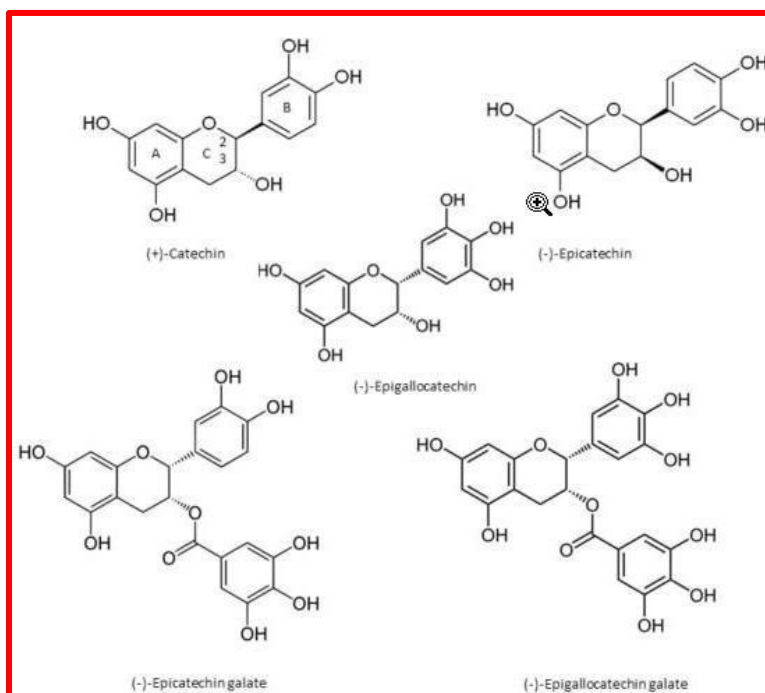


Figura 1: Principales estructuras químicas de catequinas

Fuente. Datos tomados de Lorenzo, J. & Munekata, P. (2016)

En el caso de los flavonoles que se presentan básicamente como estructuras de glicósidos, los azúcares más frecuentes son glucosa, galactosa, ramnosa, rutina. Los beneficios a la salud de estos flavonoides están reportados de estudios *in vitro* e *in vivo* (Lorenzo & Munekata, 2016) existen estudios epidemiológicos de los beneficios en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Otros estudios reportan los beneficios en la disminución de las medidas antropométricas asociadas a obesidad y síndrome metabólico (Yamaguchi, et al., 2017). Sin embargo, también puede encontrarse reportes de estudios clínicos que contradicen los efectos benéficos (Yamaguchi, *et al.*, (2017)

Tabla 2. Principales compuestos fenólicos identificados en el té verde.

Compuestos fenólicos identificados	Molécula
Flavanol	Epigallocatequina, galocatequina, galocatequina galato, epicatequina, catequina galato, epicatequina galato, epigallocatequina galato.
Flavonol	Glicósidos de kaempferol y quercetina
Ácidos fenólicos	Ácido gálico, p-cumárico y quínico.

Fuente. Datos tomados de Lorenzo, J. & Munekata, P. (2016)

2.3.4 Modelo experimental de inducción de estrés oxidativo en pez cebra.

Los estudios preclínicos en el campo de la salud abarcan modelos experimentales a nivel celular, tisular y en animales especialmente mamíferos. Para la elección de estos modelos deben tenerse en consideración además de la validez de los resultados el aspecto económico, pues un costo elevado puede ser una limitante, en cuanto a infraestructura, mantenimiento y cuidado de los animales de experimentación, incluyendo por supuesto las normas bioéticas que existen al respecto. Una alternativa es el pez cebra (*Danio rerio*), modelo animal de experimentación de bajo costo y versátil debido a su alta fecundidad, rápido desarrollo desde embrión a adulto, el relativo bajo costo en infraestructura, crianza y reproducción.

Pez cebra como modelo animal de experimentación

El pez cebra es un pez pequeño de agua dulce, cuyo origen es la India; sin embargo, se puede encontrar en acuarios de todo el mundo. Es considerado como un modelo biológico, empleado para estudios de investigación en la biología experimental, en ciencias de la salud y en el campo pre clínico, debido a las ventajas que posee, como: alta fecundidad, rápido desarrollo desde estadio embrionario hasta adulto, bajo costo que se requiere para su infraestructura, crianza y reproducción; en comparación con otras especies (Vargas-Vargas, 2017).

Existen varios métodos, pero el más usado es la hipotermia (crioanestesia: consiste en colocar al pez en agua a 4°C) y sensibilidad. Sin embargo, el mecanismo de acción aún no está claro,

pero se piensa que estaría relacionado con la actividad GABA así como el mecanismo de señalización del calcio en el sistema nervioso ((Vargas-Vargas, 2017).

Estrés inducido en el pez cebra (*Danio rerio*) con agentes químicos oxidantes:

En las últimas décadas se ha trabajado con diversos agentes oxidantes como: hierro, arsénico, cobre, cadmio, plomo, etc. para evaluar el estrés oxidativo en diferentes modelos biológicos, principalmente en organismos acuáticos, causando en ellos un incremento en la formación de radicales libres o agentes prooxidantes y a la vez una disminución en los mecanismos de defensa antioxidante de los mismos (Ochoa & Gonzales, 2008) (Prieto & Báez, 2011) (Rodríguez-Estrada, Sobrino-Figueroa & Martínez-Jerónimo, 2015) (Abraham, 2018). En este sentido, en el presente trabajo se empleó como modelo biológico el pez cebra, al cual se indujo estrés oxidativo con sulfato de cobre a una concentración de 0,2mg%, tomando como referencia el estudio de Scotto (2016).

2.3.5 Estrés oxidativo

Es la condición generada por el desbalance entre las reacciones prooxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante, o ambos. Esta situación puede comprometer la integridad celular y tisular, con alta probabilidad de relacionarse con diversos procesos patológicos. Los mecanismos celulares de defensa abarcan sistemas enzimáticos y no enzimáticos, los cuales pueden actuar en las diversas etapas de la formación de radicales libres, así como en la remoción y reparación de las biomoléculas dañadas. La cuantificación de los mecanismos antioxidantes y de los daños provocados por la condición de estrés oxidativo en sistemas biológicos puede ser usada para evaluar efectos tóxicos inducidos por diferentes clases de contaminantes ambientales, (Coronado, Vega-León, Gutiérrez, Vásquez & Radilla, 2015).

El estrés oxidativo puede ser inducido experimentalmente. Existen diversos modelos de inducción mediante diferentes agentes físicos, biológicos y químicos. Entre los modelos de inducción con agentes químicos puede producirse con compuestos químicos orgánicos como el ter-butilhidroperóxido (Kučera *et al*, 2014) el paratión y otros, y entre los inorgánicos se

encuentran las sales de metales de transición como el cobre, mercurio y cadmio, (Banni, Chouchene, Said, Kerkeni & Messauoudi, 2011).

Estrés oxidativo en la salud y enfermedad

En la actualidad se ha relacionado el estrés oxidativo con procesos fisiológicos como el envejecimiento y con más de 100 padecimientos, ya que el aumento de las EROs pueden favorecer la presencia o las complicaciones de enfermedades como: aterosclerosis, diabetes mellitus tipo II, procesos inflamatorios, el proceso isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, y diversos tipos de cáncer, entre otros; constituyendo así uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes para explicar dichos procesos (Sánchez, Santiago, Vargas & Mendoza, 2004)

Con relación al envejecimiento, hay evidencias científicas en el campo de la biogerontología que reportan que el estrés oxidativo se incrementa conforme aumenta la edad, sin embargo, existen estudios que se contraponen a esta afirmación y en los cuáles se ha observado que la actividad antioxidante se incrementa en los sujetos mayores de 70 años, así mismo se ha reportado una falta de correlación entre la acumulación del daño oxidativo y el envejecimiento; por lo que la validez de la hipótesis del estrés oxidativo durante el envejecimiento podría ser cuestionada, partiendo de que el análisis del proceso del estrés oxidativo se realiza de manera parcial ya que no considera todos los elementos involucrados, generando confusiones y problemas de interpretación teórica (Sánchez y otros, 2004)

2.3.6 Radicales libres (RL)

Un radical libre es una especie química que contienen uno electrón desapareado dentro de su estructura. Estas especies cuando son de bajo peso molecular son altamente reactivas en los sistemas biológicos, sus tiempos de vida media suelen ser segundos o fracciones de segundos, esta reactividad les permite modificar otras biomoléculas conduciéndolas a estructuras que pueden perder su función biológica, con el fin de ganar estabilidad. En los organismos aerobios, es el O_2 el primero en generar esta situación produciendo el radical libre aniónico superóxido, a partir de éste se forman las moléculas reactivas denominadas especies reactivas de oxígeno (EROs): peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, (Konigsberg, 2008).

2.3.7 Antioxidantes

Un antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, a bajas concentraciones en comparación con el oxidante, retarda o previene el proceso de oxidación de un sustrato. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres dando inicio a reacciones en cadena que potencialmente dañan a las células.

Los antioxidantes terminan estas reacciones eliminando intermediarios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos. Un tipo de clasificación de los antioxidantes es de acuerdo a su estructura y función biológica en enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y no enzimáticos (glutatión reducido, α -tocoferol, ácido ascórbico, vitaminas, oligoelementos, hormonas y polifenoles), (Konigsberg, 2008)

2.4 Marco Conceptual

- Estrés oxidativo: Es el producto del aumento de la concentración de radicales libres que provoca un desequilibrio entre la velocidad de su formación y su neutralización por los sistemas antioxidantes del organismo.
- Polifenoles: Compuestos producidos de manera natural por el té verde y que tienen como característica la presencia de más de un grupo fenol en su estructura.
- Flavonoides: Pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.
- Antioxidante: es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.
- Prooxidante: sustancia química que induce estrés oxidativo, mediante la formación de especies reactivas de oxígeno o por inhibición de los sistemas antioxidantes.
- Planta medicinal: planta (silvestre o cultivada) utilizada con fines medicinales.
- Principio activo: son los ingredientes de los medicamentos herbarios que tienen actividad terapéutica.
- Radical libre: especies químicas que poseen en el último orbital un electrón no apareado.

- Inflamación crónica: proceso inflamatorio de duración prolongada.
- ENT: Enfermedad no transmisibile.
- FAO: Organización mundial de la alimentación
- OMS: Organización mundial de la salud
- PBS: Buffer fosfato salino
- QIF: Quelación del ion ferroso

CAPITULO 3: METODOLOGIA

3.1 Tipo y diseño de investigación

La investigación es de tipo cuantitativa.

Diseño abarca una primera etapa observacional (in vitro) y la segunda etapa experimental (in vivo).

3.2 Unidad de análisis

- A) Extracto acuoso de té verde y diez extractos acuosos de cultivos de clima tropical húmedo (Tabla 3) proveniente de los departamentos de Cusco (distrito de Quillabamba) y Huánuco (distrito de Tingo María).
- B) Pez cebra silvestre adulto (*Danio rerio*) en el modelo experimental.

3.3 Selección y traslado de las muestras de hojas de té verde y de hojas de cultivos de clima tropical húmedo.

Las muestras de hojas secas de té verde entero fueron adquiridas en el mes de febrero del 2017, del almacén de una casa comercial nacional que cultiva té en la provincia de La Convención - Cusco.

En tanto que, las diez muestras de hojas frescas de cultivos de clima tropical húmedo proveniente de los departamentos de Cusco (Quillabamba) y Huánuco (Tingo María) fueron recolectadas en el lugar de origen durante los meses de noviembre y diciembre del 2018, en colaboración con docentes investigadores de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco y de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, respectivamente, para la identificación taxonómica de las mismas. Estas muestras adquiridas fueron empacadas en

bolsas de papel kraft debidamente rotuladas y transportadas vía aérea hasta el laboratorio de Bioquímica del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN) “Alberto Guzmán Barrón” para su respectivo tratamiento de desinfección, lavado y secado.

3.4 Técnicas de recolección de datos del té verde.

3.4.1 Obtención del extracto acuoso de té verde.

3.4.1.1 Lugar de ejecución:

Las hojas de té verde (anexo 1) fueron procesadas en el laboratorio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” (CIBN) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

3.4.1.2 Análisis preliminar del té verde.

a) Deseccación y molienda de las muestras de té verde.

Las hojas secas de té verde fueron directamente colocadas en la estufa a temperatura de 37°C por 24 horas para verificar su sequedad. Luego las muestras fueron trituradas, pulverizadas y pasadas por un tamiz N° 60, equivalente a una criba de 250 µm (W.S. Tyler) con el fin de obtener homogeneidad y menor tamaño de partículas para una mejor extracción. Estas muestras se usaron para preparar los extractos y realizar todos los análisis.

b) Obtención del extracto acuoso de té verde:

La preparación del extracto acuoso de té verde se realizó a una concentración del 0.5%, mediante el proceso de infusión, el cual consistió en añadir 0,5 g de té verde pulverizado a 100 ml de agua bidestilada hirviendo, se dejó en reposo durante 5 minutos, luego se enfrió en agua corriente por 15 minutos. Se filtró el extracto empleando papel Whatman N° 1. El filtrado se colocó en frasco ámbar y constituyó la muestra de ensayo para los análisis de capacidad antioxidante, polifenoles y flavonoides por espectrofotometría UV-V.

3.4.2 Determinación de algunas propiedades fisicoquímicas.

Se determinaron los siguientes parámetros para el té verde:

3.4.2.1 Densidad aparente por gravimetría

La densidad aparente se determinó colocando 1 mL del extracto acuoso en una balanza analítica y se anotó el peso. La operación se realizó por triplicado.

Tabla 3. Procedencia de las potenciales plantas medicinales de dos zonas tropicales húmedas del Perú.

Tingo María (Huánuco)	Quillabamba (Cusco)
Ishanga: <i>Urera baccifera</i>	Tahuari: <i>Tabebuia serratifolia</i>
Matico: <i>Buddleja globosa</i>	Huaranguillo, huaranguay: <i>Tecoma sambucifolia</i>
Sachaculantro: <i>Eryngium foetidum</i> L	Mango: <i>Mangífera indica</i>
Pata de vaca: <i>Bauhina candicans</i> Benth	Ajo ajo: <i>Gallesia integrifolia</i> (Spreng.) Harms
Cacao: <i>Theobroma cacao</i>	Cacao: <i>Theobroma cacao</i>

Fuente propia

3.4.2.2 Sólidos solubles por refractometría

Se basa en la medición de la densidad aparente, dada por la concentración de sólidos disueltos en suspensión, empleando para ello un refractómetro con escala de grados brix. Esta escala es un sistema de medición específica que representa el porcentaje en peso de solutos en solución de agua bidestilada a una temperatura.

La determinación de sólidos solubles presentes en el extracto acuoso de las muestras evaluadas se realizó colocando 300 de acuerdo a manual de manejo del refractómetro digital (marca Pocket Pal), de sensibilidad 0.01 brix con termómetro incluido.

3.4.3 Ensayos químicos

3.4.3.1 Actividad antioxidante in vitro: Antioxidantes:

- Capacidad antioxidante total mediante captación del radical catiónico ABTS⁺⁺ (Acido 2,2' –azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sinfónico).** Según Re et al, 1999.

Esta técnica se fundamenta en la decoloración del radical catión ABTS + (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato). El radical se genera por adición de un agente oxidante $K_2O_8S_2$ (2,5 mM). Este radical presenta un máximo de absorción espectrofotométrica a 734 nm y un intenso color verde azulado, el cual frente a la presencia de un antioxidante (molécula estabilizadora) produce una decoloración del compuesto y por tanto la disminución de la absorbancia. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox, antioxidante de referencia universal, a través de la correspondiente recta de calibrado.

b) Potencial antioxidante reductor del ion férrico (FRAP): según Benzie y Strain; 1996.

Esta técnica evalúa de forma total el potencial reductor atribuible a las especies antioxidantes presentes en los extractos acuosos. Está basado en la determinación de la concentración final de los iones Fe^{2+} (ferroso), formados por la reducción de iones Fe^{3+} (férrico), empleando 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) como un ligando del ión Fe^{+3} , complejo que cambia de color cuando el ión es reducido a Fe^{+2} , por lo que se evidencia un aumento de absorbancia, en función de la presencia de antioxidantes (reductores).

El tubo de reacción contuvo la mezcla de buffer acetato 300 mM pH 3.6, TPTZ 10 mM preparado en HCl 40mM y $FeCl_3$ 20 mM (10:1:1), se colocó 50 μ L del extracto acuoso de té verde para hacer un volumen de 1 mL y después de 10 minutos a temperatura ambiente, se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 593 nm.

La actividad antioxidante de la muestra se expresa como AAEC (ascorbic acid equivalent antioxidant capacity: mmol de ácido ascórbico/ g de muestra seca).

3.4.3.2 Identificación de catequinas (espectrograma en UV-V)

La identificación de las catequinas de los extractos acuosos del té verde por barrido espectral UV-V se llevó a cabo en el rango de 200 a 400 nm. El extracto acuoso de

hojas de té verde a una concentración de 200 µg/mL y el estándar de catequina (+) a una concentración de 0,25 mM en medio acuoso, ambas soluciones se usaron como muestra de comparación y estándar, respectivamente.

3.4.3.3 Actividad antioxidante in vitro: contenido de metabolitos secundarios:

a) Determinación de polifenoles: Desarrollado por Folin-Ciocalteu según (Singleton, 1999) y se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. utilizó el ácido gálico 20 µg/ml para preparar una curva patrón, y la lectura se realizó en el espectrofotómetro a 760 nm.

El procedimiento consistió en colocar en un tubo 0,1 mL de muestra o estándar y se adicionó 0,5 mL del reactivo de Folin Ciocalteu diluído 1:10, luego de tres minutos se añadió una solución de Na₂CO₃ 7,5% para completar un mililitro del tubo de reacción. Se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 765 nm. El tubo blanco contenía 0,1 mL de agua bidestilada en lugar de la muestra.

La concentración de fenoles totales de los extractos se expresó en micromoles de equivalentes de ácido gálico por gramo de hoja seca (µmol EAG/g hs) de tres determinaciones independientes por duplicado en cada caso.

b) Determinación de flavonoides totales: La determinación se realizó según (Geissman, 1956).

Está técnica se aplica especialmente a flavonoides de tipo catequina, por su propiedad quelante frente al aluminio (AlCl₃ 2.5%) en presencia de NaNO₂ 5% en medio alcalino NaOH 1M. La coloración de la reacción final se leyó a 510 nm. Se empleó catequina para la curva del estándar cuyas concentraciones fueron de 50 – 250 µM.

Cada tubo de reacción tenía 0,5 mL del extracto de té verde o el estándar de catequina, al cual se le agregó 150 µL de nitrito de sodio, se dejó en reposo por 5

minutos, antes de añadir 250 μ L de cloruro de aluminio, nuevamente se dejó en reposo por 6 minutos y finalmente se le añadió 250 μ L de hidróxido de sodio. La lectura se realizó después de 10 minutos a una longitud de onda de 510 nm. Se preparó también tubo blanco de reactivos y tubo blanco de muestra. La primera no tenía muestra ni estándar y el segundo no contenía el cloruro de aluminio.

Los resultados fueron expresados en mmol de catequina por gramo de muestra (mmol CQ/g).

3.4.4 Ensayos biológicos

3.4.4.1 Modelo experimental de estrés oxidativo inducido en pez cebra

Se conformaron cuatro grupos experimentales:

- **Grupo I: control negativo:** no recibieron ningún tratamiento.
- **Grupo II: control positivo:** con sulfato de cobre de concentración 0,2 mg/L.
- **Grupo III: grupo té verde:** se adicionó extracto acuoso de té verde al 0,01% preparado por infusión.
- **Grupo IV: grupo cobre + té verde:** contenía sulfato de cobre de concentración 0,2 mg/L y extracto acuoso de té verde al 0,01%. La adición del cobre y el té verde se colocó después de haberlos mezclado por 5 minutos.

La dosis empleada de sulfato de cobre, se determinó teniendo el criterio de conseguir 100% de supervivencia durante el tiempo que duró el experimento, pero con evidencia de estrés oxidativo.

El extracto del té verde como tratamiento fue preparado al 0.01 % en infusión por 5 minutos.

Las peceras contenían agua de grifería declorinadas por aireación durante 48 horas y con la adición de un declorinador químico marca Prime (2 gotas por litro) para a su vez eliminar el amonio, nitrito y nitrato.

Los peces fueron alimentados dos veces al día con alimento balanceado (marca Nutrafin) y colocados en peceras individuales con 9 unidades en cada uno, y se les

mantuvo en proceso de aclimatación durante dos semanas, a temperatura de 24°C, con aireación constante, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Luego fueron sometidos a los tratamientos según lo detallado anteriormente, siendo el tiempo de exposición 48 horas.

Para la obtención del tejido hepático, los peces fueron sacrificados por hipotermia. Se extrajeron los hígados bajo visualización de un microscopio estereoscopio trinocular, marca: NexiusZoom (Evo), con aumento entre 5X y 20X.

Los homogenizados de hígado al 5% en PBS se obtuvieron de 3 peces para cada preparación, luego se llevó a centrifugación de 2500 rpm durante 5 minutos. Los ensayos fueron realizados en el sobrenadante.

3.4.4.2 Parámetros bioquímicos

a) Catalasa (CAT): Según (Aebi, 1984), se expresará en U/mg de proteína.

La CAT tiene la capacidad de descomponer el H_2O_2 hasta H_2O . El peróxido de hidrógeno tiene absorbancia a 240 nm, luego la reacción cinética puede evaluarse espectrofotométricamente por el decaimiento de la absorbancia a esa longitud de onda. La reacción se midió durante 90 s y se realizó en buffer fosfato 50 mM a pH 7,0. La diferencia de absorbancia por unidad de tiempo es la medida de la actividad de catalasa.

Una unidad de catalasa (U) equivale a la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de un micromol de peróxido de hidrógeno por minuto, bajo las condiciones de ensayo. Se usó el coeficiente de extinción (ϵ_{240}) = 39,4 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

b) Superóxido dismutasa (SOD): Se siguió la técnica según (Marklund & Marklund, 1974). Se basa en la dismutación del radical superóxido que realiza la SOD, generado por la autooxidación del pirogalol a pH alcalino en el tubo de reacción. La reacción se mide a 420 nm.

La reacción se realizó en un medio de buffer tris HCl.

Esta reacción sigue una cinética lineal y es inhibida por SOD, se expresa en U/mg tejido.

c) Lipoperoxidación (MDA, TBARS): Según (Buege y Aust 1978), se expresará $\mu\text{mol/g}$ de tejido.

La técnica es un método colorimétrico que detecta sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) producto de la lipoperoxidación. Comprende una etapa de desproteinización, y luego se trata con el ácido tiobarbitúrico, produciendo la formación de un complejo coloreado entre el TBA y la fracción de malondialdehído presente en el homogenizado. El complejo TBA-MDA se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 535 nm.

3.5 Técnicas de recolección de datos de los cultivos de clima tropical húmedo proveniente de los departamentos de Cusco (Quillabamba) y Huánuco (Tingo María)

3.5.1 Obtención del extracto acuoso de hojas de plantas de clima tropical húmedo.

3.5.1.1 Lugar de ejecución:

Las muestras (hojas de plantas de clima tropical húmedo) fueron procesadas en el laboratorio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” (CIBN) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

3.5.1.2 Análisis preliminar de las hojas de plantas de clima tropical húmedo.

a) Dsecación y molienda de las muestras.

Las hojas provenientes de los diez cultivos de clima tropical húmedo del Perú, éstas fueron seleccionados, eliminando las deterioradas, luego lavadas con agua de grifería seguidamente con agua destilada con la adición de gotas de NaClO (hipoclorito de sodio). Seguidamente secadas con papel secante, y colocadas en la estufa a 37°C por 72 horas hasta sequedad.

Todas las muestras fueron trituradas, pulverizadas y pasadas por un tamiz N° 60, equivalente a una criba de 250 μm (W.S. Tyler) con el fin de obtener homogeneidad y menor tamaño de partículas para una mejor extracción. Estas muestras se usaron para preparar los extractos y realizar todos los análisis.

b) Obtención del extracto acuoso de hojas de plantas provenientes de Cusco y Tingo María:

Los extractos acuosos de las 10 muestras de plantas provenientes de Cusco y Tingo María (Tabla 3) fueron preparados a la concentración del 1,0%, por ebullición durante 5 min y después de un reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente y enfriados a chorro de agua, fueron llevados a centrifugación a 10000 rpm por 5 min y 4°C de temperatura, y finalmente filtrados con papel Whatman 1. El filtrado se colocó en frasco ámbar y se usó para los análisis de capacidad antioxidante, polifenoles y flavonoides por espectrofotometría UV-V.

3.5.2 Actividad antioxidante in vitro:

Los ensayos antioxidantes expresados como capacidad antioxidante se realizaron mediante la captación del radical catiónico ABTS^{•+} (Acido 2,2' -azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sinfónico) y mediante la técnica de reducción del ión férrico (FRAP), los procedimientos se realizaron tal como se procedió para el té verde (3.4.3.1).

Los ensayos adicionales de actividad antioxidante se realizaron para determinar la capacidad de descomponer peróxido de hidrógeno y quelación del ión ferroso:

a) Descomposición de peróxido de hidrógeno

Se realizó según la técnica de Ruch, Cheng & Klaunig (1989). Se preparó la solución de peróxido de hidrógeno 18 mM en buffer de fosfato salino, pH 7,4. Mediante uso del coeficiente de extinción molar 43,6 M⁻¹ cm⁻¹ se determinó la concentración del peróxido de hidrógeno a 240 nm. El estándar de referencia fue ácido ascórbico. Se preparó una curva de peróxido de hidrógeno en concentraciones de 1,0 – 18,0 mM.

El tubo de reacción fue de 1,2 mL, contenía 0,8 mL de la muestra de extracto o ácido ascórbico, después de 15 minutos a temperatura ambiente lejos de la luz se llevó a leer en un espectrofotómetro a 240 nm. Los tubos blanco de reactivo y blanco de muestra/estándar, también fueron preparados. Los resultados se expresan en descomposición de peróxido de hidrógeno (mmol H₂O₂/g hoja seca).

b) Quelación de ión ferroso (QIF)

La QIF se obtiene por la disminución de la formación del complejo de hierro (II) – ferrozina, que se midió a 562 nm. Para la reacción se mezclaron 0,5 mL de FeSO₄ 0,12 mM y 0,5 mL de muestra de 0,5 mL, se dejó en reposo durante 3 min. Luego, se añadió 0,5 mL de ferrozina 0,30 mM, el tubo se dejó en reposo por 10 min antes de medir la absorbancia. El tubo control de quelación máxima contenía sulfato ferroso y ferrozina, también se preparó un tubo blanco de muestra. Se preparó una curva de calibración de sulfato ferroso en concentraciones de 10,0 – 80,0 µM.

c) Determinación de polifenoles: Desarrollado por Folin-Ciocalteu según (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventón 1999) y se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. utilizó el ácido gálico 20 µg/ml para preparar una curva patrón, y la lectura se realizó en el espectrofotómetro a 760 nm.

El tubo de reacción contenía 0,1 mL de muestra o estándar y se le añadió 0,5 mL del reactivo de Folin Ciocalteu dilución 10 y una solución de NaCO₃ 7,5%. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se leyó a 765 nm. El tubo blanco contenía 0,1 mL de agua bidestilada en lugar de la muestra.

La concentración de fenoles totales de los extractos se expresó en micromoles de equivalentes de ácido gálico por gramo de hoja seca (µmol EAG/g hs) de tres determinaciones independientes por duplicado en cada caso.

b) Determinación de flavonoides totales: La determinación se realizó según (Geissman & Jurd, 1956).

Basada en la propiedad complejante de los flavonoides -en especial de las catequinas- frente al aluminio (AlCl₃ 2.5%) en presencia de NaNO₂ 5% en medio

alcalino NaOH 1M. La coloración de la reacción final se leyó a 510 nm. Se empleó catequina para la curva del estándar cuyas concentraciones fueron de 50 – 250 μ M.

El tubo de reacción contuvo 0,5 mL del extracto de té verde o el estándar de catequina, se le añadió 150 μ L de nitrito de sodio, se dejó en reposo por 5 minutos, luego se añadió 250 μ L de cloruro de aluminio, se dejó en reposo durante 6 minutos y finalmente se le añadió 250 μ L de hidróxido de sodio. La lectura se realizó después de 10 minutos a una longitud de onda de 510 nm. Se preparó también tubo blanco de reactivos y tubo blanco de muestra. La primera no tenía muestra ni estándar y el segundo no contenía el cloruro de aluminio.

A la misma concentración también se preparó infusiones a diferentes tiempos: 15, 30, 45 y 60 minutos con el fin de evaluar la mayor extracción de catequinas.

Los resultados fueron expresados en mmol de catequina por gramo de muestra (mmol CQ/g).

3.5.2.2 Identificación de catequinas (espectrograma en UV-V)

La identificación de las catequinas, de las diez muestras de extracto de hojas por barrido espectral UV-V se llevó a cabo en el rango de 200 a 400 nm. El extracto acuoso de hojas de té verde a una concentración de 200 μ g/mL y el estándar de catequina (+) a una concentración de 0,25 mM en medio acuoso, ambas soluciones se usaron como muestra de comparación y estándar, respectivamente.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Los resultados son expresados en promedio, desviación estándar de 3 determinaciones independientes y analizados por ANOVA, el análisis post hoc se realizó usando la prueba de Tuckey, con significancia estadística $p < 0,05$. Los análisis se realizaron utilizando el programa Excell (Microsoft 2010).

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Presentación de Resultados del té verde

Después de la preparación del extracto realizado en tres determinaciones independientes, los resultados de los parámetros fisicoquímicos se muestran en la tabla 4.

4.1.1 Los resultados de las determinaciones fisicoquímicas del extracto acuoso de té verde muestran que la densidad aparente es mayor que la del agua y los sólidos en solución son los que explican este valor por encima de 1,0 g/mL. (Tabla 4)

Tabla 4. Parámetros Físico químicos del extracto acuoso de té verde obtenido por infusión.

PARAMETROS FISICOQUIMICOS	RESULTADOS
Sólidos solubles (mg/mL) por Refractometría	3,0
Densidad Aparente (DA) (g/mL) por Gravimetría	1,022
pH (23,5°C)	5,44

4.1.2 Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* y los metabolitos secundarios

Los resultados de los análisis químicos sobre la capacidad antioxidante mediante las dos técnicas de ABTS y FRAP de los extractos acuosos se muestran en la tabla 5. La cuantificación de fenoles totales (polifenoles) mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, también corresponde a una reacción redox.

Tabla 5. Resultados de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios del extracto acuoso de té verde procedente de La Convención, Cusco.

	Promedio	DS
ABTS (TEAC mg/g)	13,4	0,8
FRAP ($\mu\text{mol Eq FeSO}_4/\text{g}$)	1310	50
Fenoles totales ($\mu\text{mol EAG/g}$)	964,0	54,7
Flavonoides ($\mu\text{mol Eq CQ/g}$)	160,7	38,0

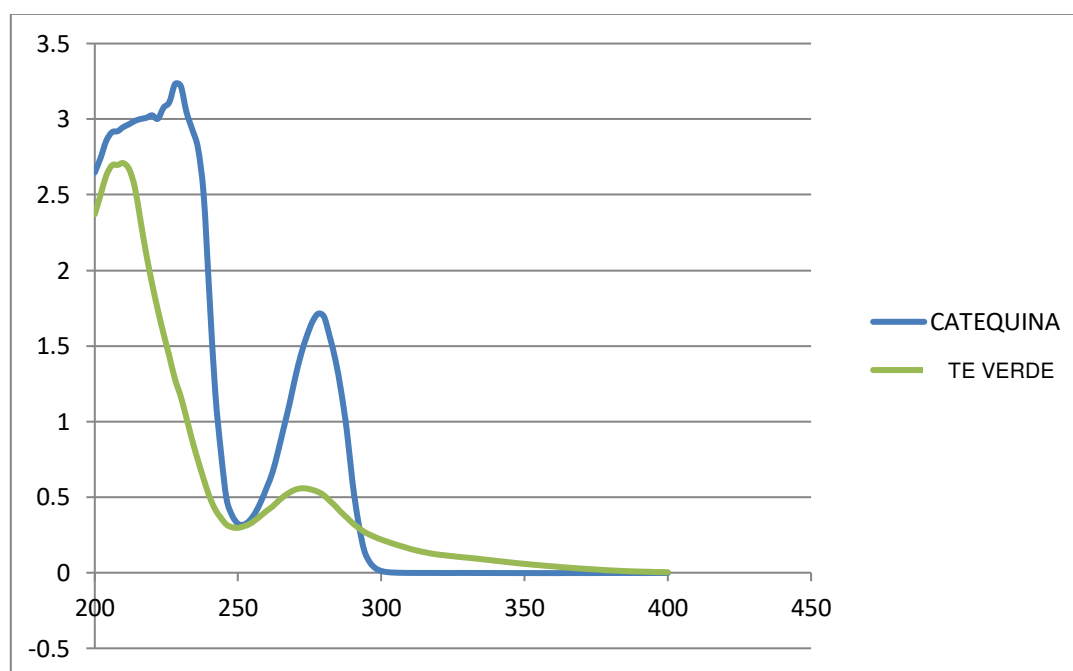


Figura 2. Barrido espectral UV-V del estándar de catequina (+) y del extracto acuoso de té verde procedente de La Convención, Cusco.

El barrido espectral del extracto acuoso del té verde muestra coincidencia con el pico de absorbancia de la catequina a la longitud de 278 nm, evidencia de la presencia de catequinas en el extracto en estudio. (Fig. 2)

4.1.3 Actividad antioxidante in vivo.

El tiempo de exposición por 48 horas produjo una supervivencia del 100% en todos los grupos. Los resultados de los efectos del extracto acuoso de té verde en un modelo de estrés oxidativo inducido por cobre, dan cuenta de los cambios significativos en los tres indicadores analizados (Tabla 6)

Tabla 6. Actividad antioxidante in vivo después de la inducción de estrés oxidativo por cobre en un modelo experimental en pez cebra

GRUPOS	USOD/mg tej		CAT mmol/min.g tej		TBARS μ mol/g tej		Relación
	promedio	DS	promedio	DS	promedio	DS	SOD/CAT
Control	1.60	0.05	15.4	0.4	74.1	7.2	0.104
Cobre	1.28	0.04	7.6	1.6	100.8	11.9	0.169
Cu + Té verde	1.60	0.05	11.8	1.7	60.3	13.9	0.136
Té verde	1.41	0.08	10.3	0.6	85.0	5.6	0.137

ANOVA: $p < 0,05$. CAT: catalasa; TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

Estos resultados mostraron diferencia significativa después del análisis de varianza $p < 0,05$. El análisis post hoc con la prueba de Tukey, mostró variación por partes como se ve en la tabla 7.

Tabla 7. Diferencia significativa por pares aplicando prueba de Tukey en los parámetros bioquímicos de estrés oxidativo en el modelo experimental en pez cebra

SOD	CATALASA	TBARS
Control - Cobre	Control - Cobre	Control - Cobre
Control - Té verde	Control - Cobre +TV	Cobre - Cobre +TV

Cobre - Cobre+TV	Control - Té verde	Cobre - Té verde
Cobre - Té verde	Cobre - Cobre+TV	
Cobre+TV - Té verde		

p< 0,05

4.2 Presentación de resultados de los extractos de los cultivos de clima tropical húmedo proveniente de los departamentos de Cusco (Quillabamba) y Huánuco (Tingo María)

Los resultados de parámetros fisicoquímicos determinados en los 10 extractos acuosos de hojas seleccionadas de los departamentos de Cusco y Huánuco se muestran en la Tabla 8. Puede notarse que no existe una relación directa entre el contenido de sólidos solubles con la densidad aparente ($r = 0.167$).

Tabla 8. Resultados fisicoquímicos de sólidos solubles y densidad aparente de los extractos de diez plantas procedentes de Cusco y Huánuco

EXTRACTO DE HOJA SECA	Sólidos solubles (mg/mL)	Densidad Aparente (DA) (g/mL)
	temperatura 29,2±0,15 (por refractrometría)	(por gravimetría)
Huaranguillo	4,0	1,0076
Tahuari	3,0	0,9978
Ajo ajo	2,0	1,0031
Mango	3,0	1,0019
Cacao (Quillabamba)	2,0	0,9989
Cacao (Tingo María)	1,0	0,9977
Ishanga	3,0	1,0020
Matico	3,0	1,0080

Sacha culantro	3,0	0,9988
Pata de vaca	4,0	0,9940

Tabla 9. Actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y flavonoides de extractos acuosos de hojas de diez plantas de dos zonas tropicales húmedas de dos regiones del Perú.

EXTRACTO HOJAS SECAS	Fenoles totales		Flavonoides		ABTS ⁺		F/P
	μmol EAG /g hs		μmol Cateq-E/g hs		mg TEAC/g hs		
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	
Huaranguillo (*)	173	37,3	37,4	4,1	44,7 ^c	0,4	0,22
Tahuari (*)	75,3	25,4	20,2	1,3	24,6	1,2	0,27
Ajo ajo (*)	49,3	1,50	8,4	0,5	19,9	1,1	0,17
Mango (*)	717 ^a	35,8	89,6 ^b	1,9	281,6 ^a	2,6	0,12
Cacao (*)	54,5	9,9	15,2	2,0	12,0	3,1	0,28
Cacao (**)	324 ^b	63,7	108 ^a	3,3	86,6 ^b	2,3	0,33
Ishanga (**)	213 ^c	38,2	61,9	9,5	42,1 ^c	2,1	0,29
Matico (**)	183	39,5	42,6	5,7	22,2	3,2	0,23
Sacha culantro (**)	187	35,9	78,6 ^b	3,3	27,7	4,8	0,42
Pata de vaca (**)	231 ^b	40,3	50,5	4,5	38,7	6,0	0,22

hs: hojas secas. F/P: flavonoides/fenoles totales. $p < 0,05$; letras iguales no tienen diferencia significativa en cada columna.

(*) Plantas provenientes de Quillabamba (**) Plantas provenientes de Tingo María

Aun así, las hojas de mango exhiben la mayor capacidad antioxidante expresado como TEAC-ABTS, seguido de las hojas de cacao de Tingo María (Tabla 9), el mismo comportamiento se observa en los resultados de la capacidad antioxidante expresado como FRAP (Tabla 10). También debe notarse la diferencia observada entre las hojas de cacao de Cusco y de Tingo María, mostrando esta última una capacidad antioxidante mayor en más de

cinco veces a la del Cusco. Esta mayor capacidad antioxidante guarda relación directa con el mayor contenido de fenoles totales en las hojas de cacao de Tingo María.

La QIF y descomposición de peróxido de hidrógeno. En la tabla 10, se observa que la capacidad de fijación del ión ferroso es mayor en el extracto de ishanga, en un 22%, aunque sin significancia, con el segundo que corresponde a las hojas de cacao procedente de Tingo María, los dos siguientes quelantes importantes son los extractos de las hojas de Quillabamba y luego las hojas de mango (Tabla 10).

Tabla 10. Quelación del ión ferroso (QIF), potencial antioxidante reductor de ión férrico (FRAP) y descomposición de peróxido de hidrógeno de dos zonas tropicales húmedas de dos regiones del Perú.

EXTRACTOS DE HOJAS SECAS	QIF		Descomposición H ₂ O ₂		FRAP	
	μmol Eq Fe ⁺² /g hs		mmol H ₂ O ₂ /g hs		μmol FeSO ₄ /g hs	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
Huaranguillo	3,2	0,4	3,4	1,3	704	52
Tahuari	20,8 ^{b,c}	0,7	1,3	0,3	416	43
Ajo ajo	8,1	1,6	1,2	0,2	128	9
Mango	16,0 ^c	1,9	21,5 ^b	0,9	3866 ^a	169
Cacao (Quillabamba)	16,6 ^c	2,8	1,0	0,2	236	28
Cacao (Tingo María)	25,7 ^{a,b}	1,8	53,1 ^a	5,3	1931 ^b	38
Ishanga	32,9 ^a	0,4	7,0 ^c	0,8	793	147
Matico	12,1	2,1	3,8	0,2	844 ^c	75
Sacha culantro	5,2	1,3	1,6	0,3	1396 ^b	38
Pata de vaca	15,8	1,6	5,5 ^c	2,6	827	122

hs: hoja seca. p<0,05; letras iguales no tienen diferencia significativa en cada columna

El valor QIF de los dos primeros son mayores significativamente frente a los dos siguientes mencionados. Aun cuando el resto de los extractos fueron menores todos expresaron tener un valor medible de QIF.

El mejor extracto capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno corresponde a las hojas de cacao procedente de Tingo María seguido de las hojas de mango, la diferencia entre ambos fue significativa. Los demás extractos expresaron niveles significativamente menores a los dos de mayor capacidad de descomposición de hidrógeno.

4.3 Espectrograma en UV-V de los 10 extractos acuosos

Los resultados del barrido espectral desde 200 a 400 nm (Figura 3) muestran que cuatro de ellos (Cacao de Tingo María, Cacao de Quillabamba, Ishanga y Tahuari) tienen pico de absorbancia entre 270-278 nm. Lo notorio es que el extracto de las hojas de mango no se encuentra entre ellos, se entiende entonces que los metabolitos secundarios que le dan la mayor capacidad antioxidante no pertenecen al grupo de catequinas.

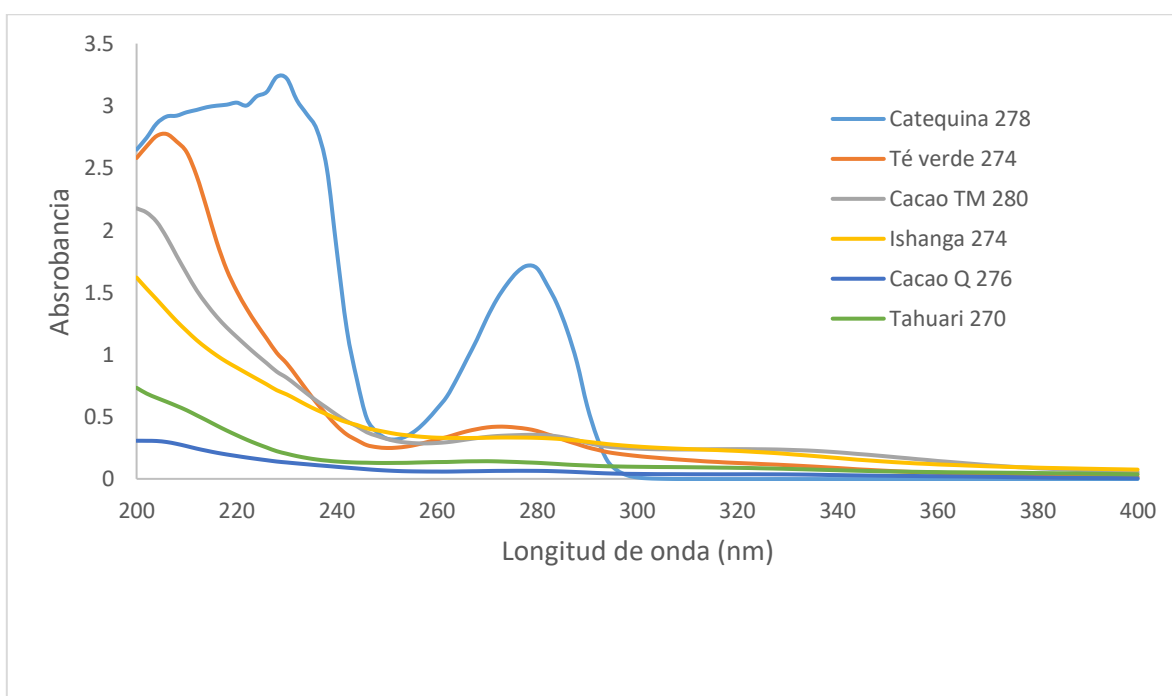


Figura 3. Espectrograma de los extractos acuosos de las hojas con aproximación al pico de absorbancia del estándar catequina y té verde.

4.4 DISCUSIÓN

Los resultados *in vitro* sobre la actividad antioxidante y metabolitos secundarios del extracto de té verde obtenidos en el estudio (Tabla 5) muestran resultados concordantes con las referencias sobre el principal contenido de flavonoides como parte de los fenoles totales de esta hoja cultivada en el territorio nacional. La zona geográfica de cultivo tiene las características edáficas y climáticas que favorecen la producción de un té que conserva la composición que le corresponde. Esta composición de flavonoides corresponde a la presencia de catequinas principalmente. En la figura 2, se observa la coincidencia del pico de absorbancia con la molécula estándar.

Un estudio ha demostrado que el área geográfica, así como los factores abióticos: temperatura, lluvias y tiempo de exposición al sol, influyen en los niveles de concentración de metabolitos en el té verde (Lee, y otros, 2010). Del mismo modo, también se ha reportado que la geografía tiene un impacto en el contenido de catequinas y polifenoles del té verde, influyendo en el rendimiento y calidad del producto, especialmente en los parámetros sensoriales asociados al sabor (Ahmed, S., Griffin, T., Kraner, D., Schaffner, M., Sharma, D., Hazel, M., Leitch, A., Orians, C., Han, W., Stepp, J., Robbat, A., Matyas, C., Long, Ch., Houser, R. & Cash, S., 2019)

La capacidad antioxidante *in vitro* también muestra correspondencia con los resultados hallados en el modelo experimental *in vivo*, así se demuestra el efecto protector a nivel de la disminución significativa de la lipoperoxidación expresada como TBARS (Tabla 6).

A nivel de las actividades enzimáticas, también se han mostrado diferencias significativas (Tablas 6 y 7); así la actividad de la SOD del grupo tratado con cobre y té verde se recuperó hasta los valores del grupo control (1,6 USOD/mg) después de haber exhibido una disminución cuando los peces fueron sometidos al estrés oxidativo con el cobre (1,28 USOD/mg tejido). Teniendo en cuenta que la SOD cataliza la dismutación del radical superóxido y produce peróxido de hidrógeno, molécula que también forma parte de las ROS, con el potencial agresor al medio celular por su mayor tiempo de vida con respecto a los radicales ROS; la célula dispone de la enzima catalasa para la reducción del peróxido de

hidrógeno. En los resultados la actividad de esta enzima (Tablas 6 y 7) muestra una actividad significativamente reducida bajo el tratamiento con cobre (7,6 mmol H_2O_2 /min.g tejido), y la adición del extracto de té verde todavía no muestra la misma recuperación significativa (11,8 mmol H_2O_2 /min.g tejido) aun cuando el incremento de la actividad frente al grupo tratado con cobre es de 55% mayor. Ambas actividades enzimáticas deberían actuar de forma coordinada con el fin de establecerse un buen estado de defensa antioxidante, teniendo en cuenta que la relación de estas enzimas (SOD/CAT) en el grupo control es 0,104, el grupo tratado con cobre está 62,5% por encima de éste (SOD/CAT: 0,169), lo que demuestra una menor actividad de la catalasa, sin embargo, en el grupo inducido a estrés y tratado con el extracto de té verde (SOD/CAT: 0,136) es sólo del 30,8% indicando un proceso de recuperación de la enzima catalasa.

Si bien el cobre es considerado un micronutriente en la dieta diaria, es conocida que una disminución o una sobrecarga de este metal puede producir desbalances metabólicos relacionados con patologías (Pereira, T., Campos, M & Bogo, M. 2016). Un elevado nivel de cobre promueve la generación y propagación de radicales libres y la formación de ROS, que promueve procesos inflamatorios. En el modelo de pez cebra, también se han ensayado modelos de exposición a cobre a diferentes niveles. Craig *et al.* (2007) produjeron estrés oxidativo por exposición aguda de cobre, emplearon dosis subletal de 15 μ g/L por 48 horas, los hallazgos mostraron un incremento de los daños oxidativos y a nivel enzimático mostraron una disminución significativa de la expresión de genes de SOD y un incremento de la expresión de catalasa. Nuestros resultados bajo la exposición de cobre a concentración de 200 μ g/L con sobrevivencia al 100% durante 48 horas, han mostrado una disminución significativa de la actividad de SOD, lo que significa una disminución en la capacidad de dismutar el radical superóxido, llevando a un incremento del radical libre que podría inhibir la actividad de catalasa (Kono & Fridovich, 1982) como se muestra en la tabla 6. Los resultados de Craig, Wood & Mc Clelland (2007) se realizaron a nivel de expresión de genes, siendo este mecanismo de largo plazo, es posible que esta actividad disminuida de catalasa sería el estímulo para una posterior expresión de catalasa o también puede ser el resultado de la mayor dosis de cobre 200 μ g/L usado en el tratamiento de este trabajo.

Por otro lado, estudios realizados por Sandrini, Bianchini, Trindade, Nery & Marins (2009) en hepatocitos de pez cebra en concentraciones de 5 – 30 mg/L, mostraron que la exposición a 20mg Cu/L por 6, 12 y 24 horas incrementaron la formación intracelular de ROS. Existe grandes diferencias sobre resultados e información derivada de estos dos modelos de estudio, el cultivo celular es un modelo *in vitro* y el desarrollado por el presente estudio es *in vivo*. Los estudios *in vitro* suelen preceder al estudio *in vivo*, pero este último es el más productivo dentro de los ensayos preclínicos. Otro estudio realizado en un modelo de exposición aguda y subletal de óxido de cobre (40 y 60 mg/L) en nanopartículas en embriones de pez cebra causaron un estado de estrés oxidativo expresado por la disminución de las actividades de SOD y catalasa, tal como lo hallado en el presente estudio (Ganesan, Anaimalai-Thirumurthi, Raghunath, Vijayakumar, & Perumal, 2016).

Los resultados de (Liu, Wang, Cao, & Lin, 2017) sobre la exposición a metales incluyó el cobre y reportan que la DL50 del cobre fue de 90 µg/L, concentración menor al usado en el presente estudio, y que la adición de una sustancia quelante como el ácido poliaspártico produjo la sobrevivencia de todos los peces con los diversos tratamientos atenuando así la toxicidad de los metales pesados en el pez cebra. Al respecto la literatura refiere que las catequinas, principales flavonoides de té verde también exhiben además de su actividad antioxidante a través de la captación de ROS, un papel quelante de iones metálicos, entre ellos el cobre; lo que explicaría que uno de los mecanismos de protección frente al cobre sería la quelación de este metal, evitando la reacción de generación y propagación de ROS.

En el caso de la actividad *in vitro* de las 10 hojas de plantas seleccionadas de los departamentos de Cusco y Huánuco, también han mostrado resultados prometedores que permiten relacionarlos con el extracto de té verde.

Con respecto al contenido de polifenoles, el extracto de hojas de mango mostró un contenido mayor (Tabla 9), en comparación con el extracto de cacao proveniente de Tingo María. Los resultados de los análisis de las hojas de cacao provenientes de dos zonas de clima tropical húmedo, las de Tingo María exhibieron resultados notoriamente más elevados

($p < 0,05$) en comparación con las de Quillabamba. Esto pudo deberse a los factores abióticos de la zona como, por ejemplo: geografía o tipo de suelo, exposición horas luz, época de estación con presencia de abundantes precipitaciones, etc; ya que el área de cultivo en el caso de Tingo María, los factores fueron favorables en cuanto a luz y tipo de suelo, en tanto que, para el caso de Quillabamba fue lo contrario. Por otro lado, pese haber existido una diferencia significativa en lo que refiere al contenido de fenoles totales y flavonoides entre los dos extractos de cacao, el cociente entre flavonoides/polifenoles (F/P) mostrado en la tabla 9, no presentó diferencia significativa, lo que muestra que existe una correlación entre flavonoides y fenoles totales. Mientras que, al comparar el extracto de cacao de Tingo María con el extracto de pata de vaca no mostró una diferencia significativa, exhibiendo este último un 29% menor en el contenido de fenoles totales.

El Contenido de Fenoles (CF) fue mayor en el cacao proveniente de Tingo María, seguido de la hoja de mango, que expresado en la relación F/P es marcadamente menor para la hoja de mango (Tabla 9); que solo alcanzó un 0,12 frente al 0,33 del cacao, así mismo, en el barrido espectral (figura 3) se observa que el mango no coincide con la longitud de onda de la catequina en el rango de 270 a 278 nm, ni del té verde, por lo que podríamos decir que el contenido de flavonoides en la hoja de mango no corresponde a la catequina.

Los principales metabolitos secundarios de las hojas de mango corresponden a compuestos fenólicos del núcleo de benzofenona, iriflofenona, seguido de la xantona mangiferina y otros fenoles como el ácido gálico, además de otros grupos menores de flavonoides del grupo de flavan-3-oles tipo catequina y epicatequina (Gu, Yang, Zhou, Khan, Cao & Cheng, 2019). Ambos metabolitos iriflofenona y mangiferina tienen comportamiento como antioxidantes (Stohs, Swaroop, Moriyama, bagchi & Ahmad, 2018). La iriflofenona 3-C- β -glucósido es una molécula polar y su presencia en el extracto preparado sería parte de la capacidad antioxidante demostrada en este y otros estudios reportados. (Barreto, J. C., Trevisan, M. T., Hull, W. E., Erben, G., De Brito, E. S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalder, B. & Owen, R. W., 2008) (Gururaja, Mundkinajeddu, Kumar, Dethe, Allan & Agarwal, 2017) (Ndoye, S. F., Fraisse, D., Akendengué, B., Dioum, M., Gueye, R., Sall, C., Seck, J., Felgins, C., Seck, M. & Senejoux, F., 2018). Por otro lado, las actividades biológicas de este polifenol

reportados en diversos estudios in vitro también han mostrado capacidad inhibitoria de la lipasa y colesterol esterasa (Gururaja, Mundkinajeddu, Dethe, Sangli, Abhilash & Agarwal, 2015), así como capacidad hipoglicemiante y antiglicante (Gururaja y otros, 2017) constituyendo un potencial de actividad antiobesidad o antidiabetes (Das y otros, 2015) (Parbuntari, Prestica, Gunawan, Nurman & Adella, 2018).

La literatura, en el caso de las hojas de cacao, también reportan que su principal metabolito corresponde al grupo de fenoles siendo los flavonoides más importantes la epicatequina seguida de epigallocatequina galato (Duresa, 2017). Estos metabolitos han mostrado diversas bioactividades (Min y otros 2013) sin embargo la mayoría de la información no deriva de los estudios en las hojas.

Considerando los resultados expuestos, esta parte de la planta constituye un área potencial de investigación que merece ser continuada en cuanto a las propiedades antioxidantes, antihipertensivas, antiobesidad y como un anticancerígeno (Rodríguez-Pérez, Segura-Carreto & Del Mar Contreras, 2019) (Parbuntari y otros, 2018) (Martín y otros, 2016). El alto contenido de metabolitos del grupo de los flavonoides expresado como equivalente a catequina, como parte de los fenoles totales se refleja en la relación F/P=0,33 (Tabla 9), este valor es superior al prototipo estudiado de extracto del té verde (tabla 5). Puede notarse también que, aunque el extracto de las hojas de cacao proveniente de Quillabamba mostró un menor contenido de fenoles totales y flavonoides en comparación con la de Tingo María, la relación F/P no fue muy diferente (0,28), entonces las fracciones de FT y CF se conservan proporcionalmente.

La relación F/P de las hojas de mango exhibe un menor valor (F/P= 0,12) que los extractos de té verde y cacao, se explicaría porque como se ha mencionado los principales componentes fenólicos pertenecen al grupo de benzofenonas y xantonas, y la presencia de catequinas y otros relacionados son bastante escasos. (Gu, C y otros, 2019).

El comportamiento antioxidante de los extractos acuosos de las diez variedades de hojas procedentes de Quillabamba y Tingo María han mostrado una diversidad de comportamiento antioxidante, los resultados cuantitativamente son variados frente al radical libre ABTS^{•+} y en la capacidad de reducir el Fe⁺³ (FRAP).

En el caso del extracto de hojas de mango, aun con un bajo contenido de flavonoides equivalentes a catequinas, exhibe la mayor capacidad antioxidante expresado como TEAC, seguido de las hojas de cacao de Tingo María (Tabla 9), el mismo comportamiento se observa en los resultados de la capacidad antioxidante expresado como FRAP (Tabla 10). También debe notarse la diferencia observada entre las hojas de cacao de Cusco y de Tingo María. La de Tingo María tiene una capacidad antioxidante mayor en más de cinco veces a la del Cusco. Esta mayor capacidad antioxidante guarda relación directa con el mayor contenido de fenoles totales en las hojas de cacao de Tingo María.

En estos dos ensayos de capacidad antioxidante pueden resaltarse las propiedades significativamente mayores ($p < 0,05$) de las hojas de mango y de cacao procedente de Tingo María, seguido de huaranguillo e ishanga en la prueba frente al radical libre (Tabla 9). Teniendo en cuenta que en el presente estudio los extractos se obtuvieron en medio acuoso y en un solo paso, los valores son menores a otros reportados pero obtenidos en solventes orgánicos y en extracciones sucesivas (Badmus y otros, 2011) (Duresa, 2017) (Morsi y otros, 2010), son resultados promisorios porque el comportamiento antioxidante podría aumentar realizando otras modificaciones del procedimiento sin cambiar el solvente.

Los mejores resultados de la capacidad reductora significativa, con la técnica del FRAP, fueron para las hojas de mango y de cacao procedente de Tingo María, seguidos de sachaculantro y matico (Tabla 10).

Estas propiedades antioxidantes de los mismos extractos, mango y cacao de Tingo María, frente a dos técnicas de medición de capacidad antioxidante total, muestran que pueden compartir algunos grupos químicos comunes de metabolitos secundarios. Este comportamiento antioxidante puede atribuirse entonces al contenido de fenoles totales, pues la tabla 9 muestra que ambos extractos acuosos, de mango y cacao de Tingo María también contienen los mayores niveles significativos; sin embargo, no se observan los mismos resultados en el contenido de flavonoides equivalentes a catequina, ya que en la relación F/P

se mostró 0,33 para el cacao y 0,12 para el mango, lo que refleja la diferencia significativa del contenido de catequinas entre estos dos extractos (Tabla 9).

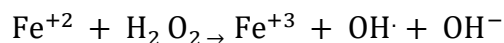
La quelación del ión ferroso de los diez extractos analizados mostrados en la Tabla 10, dan cuenta que todos tienen valores medibles, estos resultados son importantes porque la literatura refiere que algunos extractos de plantas no han demostrado esta propiedad (Masibo & He, 2008), (Lim y otros, 2007).

En la tabla 10, se observa que la QIF es mayor en el extracto de ishanga, en un 22%, aunque sin significancia, con el segundo que corresponde a las hojas de cacao procedente de Tingo María, seguido de las hojas de tahuari y luego los extractos de las hojas de cacao de Quillabamba y las hojas de mango.

El valor QIF de los dos primeros (ishanga y cacao de Tingo María) son mayores significativamente frente a los dos siguientes (cacao de Quillabamba y mango).

El extracto de cacao de Tingo María también exhibe la mayor capacidad de descomponer peróxido de hidrógeno (Tabla 10) significativamente mayor que el extracto de mango. Sin embargo, esta propiedad no es compartida por el extracto de ishanga que tiene un valor significativamente menor a los dos primeros, los siguientes extractos muestran valores diferentes y menores sin significancia.

Ligando ambas técnicas, QIF y capacidad de descomponer peróxido de hidrógeno, constituyen un potencial aplicativo en patologías asociadas a procesos inflamatorios y de estrés oxidativo como las ENT, por la reacción que se produce entre el H_2O_2 y el metal de transición. La reacción de Fenton es una de las más conocidas como iniciadora de reacciones de radicales libres:



La formación biológica del H_2O_2 se genera principalmente como producto de la dismutación enzimática del superóxido, siendo una molécula no radical libre, pero formando parte de las ROS, su tiempo de vida media es mayor que cualquier radical libre, esta relativa estabilidad

le permite generar reacciones prooxidantes en ambientes diferentes a su fuente de origen, en presencia del ion ferroso pueden generar el radical hidroxilo (OH^\bullet), radical libre con alta capacidad oxidante. Luego, los extractos que exhiben ambas propiedades tendrán mayor proyección como antioxidantes para las diversas situaciones de estrés oxidativo asociadas a patologías crónicas como las mencionadas ENT.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de té verde obtenido por infusión exhibe propiedades antioxidantes expresadas como TEAC y FRAP, y su contenido de fenoles totales incluye a la catequina como el prototipo de sus flavonoides.
2. El extracto acuoso de té verde a la dosis de 10 mg % exhibe un efecto protector expresado en TBARS y produce una recuperación de la actividad enzimática de SOD y catalasa, siendo significativa en la dismutación del radical superóxido.
3. La zona geográfica tropical húmeda del territorio nacional donde se cultiva el té, también tiene plantas como el cacao, tahuari, ishanga, mango, con actividades antioxidantes y fenoles totales comparables con el té verde. Correspondiendo al cacao además el mayor contenido de catequinas.
4. El extracto acuoso de hojas de mango es importante por su alta capacidad antioxidante, analizado por diversos mecanismos, y su alto contenido de fenoles totales, pero con bajo contenido de catequinas.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados sobre las hojas de cacao y de mango, se debe realizar estudios en hojas de plantas donde formen parte de los productos secundarios, puesto que es muy probable una revaloración de sus funciones

Para contribuir con el medio ambiente se debe ensayar la extracción solo con agua, ya que es posible extraer metabolitos secundarios con potencial antioxidante y otras aplicaciones.

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abraham Felipe, A. (2018). Estrés oxidativo inducido por arsénico en branquia de carpa común *Cyprinus carpio*. Tesis para obtener el título de químico farmacéutico biólogo, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Ahmed, S., Griffin, T., Kraner, D., Schaffner, M., Sharma, D., Hazel, M., Leitch, A., Orians, C., Han, W., Stepp, J., Robbat, A., Matyas, C., Long, Ch., Houser, R. & Cash, S. (2019). Environmental factors variably impact tea secondary metabolites in the context of climate change. *Front. Plant Sci*, 10, 939. doi:doi:10.3389/fpls.2019.00939
- Badmus, J. A., Adedosu, T. O., Fatoki, J. O., Adegbite, V. A., Adaramoye, O. A., & Odunola, O. A. (2011). Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of *Mangifera indica*. *Acta Pol Pharm*, 68(1), 23-9.
- Banni, M., Chouchene, L., Said, K., Kerkeni, A., & Messaoudi, I. (2011). Mechanisms underlying the protective effect of zinc and selenium against cadmium-induced oxidative stress in zebrafish *Danio rerio*. *Biometals*, 24(6), 981-992.
- Barreto, J. C., Trevisan, M. T., Hull, W. E., Erben, G., De Brito, E. S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalder, B. & Owen, R. W. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14), 5599-5610.
- Bopp S.K., Minuzzo M., & Lettieri T., (2006). *The Zebrafish (Daniorerio): An Emerging Model Organism in the Environmental Field*. Scientific and Technical Research series. 24.

- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52, 302-310.
- Castañeda C. B., Q.F. Ramos, LL. E. & Ibáñez V. L. 2008. Revista Horizonte Médico. Volumen 8, N° 1
- Chambi, C., Abigai, S., & Coaquira Mamani, N. S. (2019). Efecto inhibitorio del extracto de ajo (*Allium Sativum*) vs Te verde (*Camelia Sinensis*) sobre *Streptococcus Mutans* a las 24 y 48 horas, Puno–2018.
- Chang, K. (2015). World tea production and trade. Current and future development. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Chen, Y. L.; Jiang, Y. M.; Duan, J.; Shi, J.; Xue, S. & Kakuda, Y. (2010) Variation in catechin contents in relation to quality of 'Huang ZhiXiang' oolong tea (*Camellia sinensis*) at various growing altitudes and seasons. *Food Chem.* 119: 648-652.
- Coronado, M.; Vega y León, S.; Gutiérrez, R.; Vázquez, M. & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana *RevChilNutr.* 42(2), 206-212.
- Craig, P. M., Wood, C. M., & Mc Clelland, G. B. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(5),
- Das, S., Alam, M. N., Batuta, S., Roy, N., & Begum, N. A. (2015). Exploring Comparative Antioxidant Activity of Some Popular Cultivars of *Mangifera indica* L., National Fruit of India. *International Journal of Fruit Science*, 15(2), 129-147.
- Davico, C.; Poletta, GL.; Loteste, A.; Scagnetti, JA.; Campana, M.; Parma, MJ. & Simoniello, MF. (2012). Evaluación de estrés oxidativo en juveniles de *Prochilodus holineatus* expuestos a cipermetrina. *Revista FABICIB.* 16, 157–166.
- Díaz E., (2006). *El Danio cebra como animal de laboratorio*. Animales de laboratorio, núm. 34: 4-39
- Dolagaray, I. (1993). *El Libro del Té*. San Diego-USA: Pirámide
- Duresa, L. W. (2017). Phytochemical screening and antioxidant activity of selected mango (*Mangifera indica* L.) and avocado (*Persea Americana*) fruits in Illu Ababor zone, Oromia regional state, Ethiopia. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 10(5), 24-28

- Enfermedades No Transmisibles. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Fernandez, P. L.; Pablos, F.; Martin, M. J. & Gonzalez, A. G (2002). Study of catechin and xanthine tea profiles as geographical tracers. *J. Agric. FoodChem.* 50, 1833-1839.
- Ganesan, S., Anaimalai Thirumurthi, N., Raghunath, A., Vijayakumar, S., & Perumal, E. (2016). Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 36(4), 554-567.
- Geissman, T. A. & Jurd, L., (1956). Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. *Journal of OrganicChemistry*, 21(12), 1395-1401.
- Gindri, A. L., De Souza, L. B., Cruz, R. C., Boligon, A. A., Machado, M. M., & Athayde, M. L. (2014). Genotoxic evaluation, secondary metabolites and antioxidant capacity of leaves and roots of *Urera baccifera* Gaudich (Urticaceae). *Natural product research*, 28(23), 2214-2216.
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive medicine*, 21(3), 334-350.
- Gu, C., Yang, M., Zhou, Z., Khan, A., Cao, J., & Cheng, G. (2019). Purification and characterization of four benzophenone derivatives from *Mangifera indica* L. leaves and their antioxidant, immunosuppressive and α -glucosidase inhibitory activities. *Journal of functional foods*, 52, 709-714.
- Gururaja, G. M., Mundkinajeddu, D., Dethe, S. M., Sangli, G. K., Abhilash, K., & Agarwal, A. (2015). Cholesterol esterase inhibitory activity of bioactives from leaves of *Mangifera indica* L. *Pharmacognosy research*, 7(4), 355.
- Gururaja, G. M., Mundkinajeddu, D., Kumar, A. S., Dethe, S. M., Allan, J. J., & Agarwal, A. (2017). Evaluation of cholesterol-lowering activity of standardized extract of *Mangifera indica* in albino Wistar rats. *Pharmacognosy research*, 9(1), 21.
- Hill, A. J., Howard, C. V., and Cossins, A. R. (2002). Efficient embedding technique for preparing small specimens for stereological volume estimation: Zebrafish larvae. *J. Microsc.* 206, 179–181.

- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H. & Fu, Z. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78(7), 846-852.
- Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., & Fu, Z. (2011). Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 82(3), 398-404.
- Kanwar, J., Taskeen, M., Mohammad, I., Huo, C., Chan, T. H., & Dou, Q. P. (2012). Recent advances on tea polyphenols. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 4, 111–131.
- Kishi, S., Uchiyama, J., Baughman, A.M., Goto, T., Lin, M.C. & Tsai, S.B. (2003). The zebrafish as a vertebrate model of functional ageing and very gradual senescence. *Experimental Gerontology*, 38: 777-786.
- Konigsberg, M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas. Manual Moderno*.
- Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5751-5754.
- Kučera, O.; Endlicher, R.; Roušar, T.; Lotkova, H.; Garnol, T. & Cervinkova, Z. (2014). “The Effect of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes *in Vitro*,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 752506.
- Lee, J. E., Lee, B. J., Chung, J. O., Hwang, J. A., Lee, S. J., Lee, C. H., & Hong, Y. S. (2010). Geographical and climatic dependencies of green tea (*Camellia sinensis*) metabolites: a ¹H NMR-based metabolomics study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10582-10589.
- Leena, P.; Balaraman, R. (2005). Efectos del extracto de té verde sobre los daños oxidativos inducidos por cisplatino en riñones y testículos de ratas. *ArsPharm*. 46(1), 5-18.
- Lim, Y. Y., Lim, T. T., & Tee, J. J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food chemistry*, 103(3), 1003-1008.
- Liu, T., Wang, R., Cao, H., & Lin, A. (2017). Polyaspartic acid alleviates heavy metal toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemistry and Ecology*, 33(7), 684-693.

- Lizárraga-Velázquez, C. E., Hernández, C., González-Aguilar, G. A., & Heredia, J. B. (2019). Effect of dietary intake of phenolic compounds from mango peel extract on growth, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Latin american journal of aquatic research*, 47(4), 602-611.
- López Rodríguez, G. D. P. (2014). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* (té verde) frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC) 10556. Labra, C., & Denis, D. (2018). Efecto bactericida del extracto acuoso de la *Camellia sinensis* “té verde” y glutaraldehído al 2% en siliconas de adición contaminada con *Streptococcus salivarius*, Arequipa, 2018.
- Lorenzo, J. M., & Munekata, P. E. S. (2016). Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 709-719.
- Marklund S & Marklund G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Biochemistry*. 47:469-74.
- Masibo, M., & He, Q. (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(4), 309-319.
- Min, S. Y., Yang, H., Seo, S. G., Shin, S. H., Chung, M. Y., Kim, J., Lee, S.J., Lee, H.J & Lee, K. W. (2013). Cocoa polyphenols suppress adipogenesis in vitro and obesity in vivo by targeting insulin receptor. *International Journal of Obesity*, 37(4), 584-592.
- Moroni, H.; Martinez, E.; Gutierrez, M.; Ramos, D.; Nuñez, M.; Lizarraga, M.; Burga, J.; Tello, J.; Trevejo, I. (2007). Efecto antimicrobiano in vivo de la infusión de *Camellia sinensis* sobre bacterias orales. *Odontol. Sanmarquina* 10(2): 12-14.
- Morsi, R. M., El-Tahan, N. R., & El-Hadad, A. M. A. (2010). Effect of aqueous extract *Mangifera indica* leaves, as functional foods. *Journal of Applied Sciences Research*, 6(6), 712-721.

- Ndoye, S. F., Fraisse, D., Akendengué, B., Dioum, M., Gueye, R., Sall, C., Seck, J., Felgins, C., Seck, M. & Senejoux, F. (2018). Antioxidant and antiglycation properties of two mangoes (*Mangifera indica* L.) cultivars from Senegal. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(3), 137-141.
- Ochoa, DM.; Gonzales, JF. (2008). Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Rev. Med. Vet. Zoot.*55, 115-126.
- Palacio, E.; Ribero, M.E. y Restrepo, J.C. (2013). Toxicidad hepática por té verde (*Camelliasinensis*): Revisión de tema. *Rev Col Gastroenterol*28(1), 46-52.
- Parbuntari, H., Prestica, Y., Gunawan, R., Nurman, M. N., & Adella, F. (2018). Preliminary Phytochemical Screening (Qualitative Analysis) of Cacao Leaves (*Theobroma cacao* L.). *EKSAKTA: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 19(2), 40-45.
- Pereira, T. C. B., Campos, M. M., & Bogo, M. R. (2016). Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. *Journal of Applied Toxicology*, 36(7), 876-885.
- Pereira, V. P., Knor, F. J., Velloso, J. C. R., & Beltrame, F. L. (2014). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16(3), 490-498.
- Perva Uzunalic, Amra & Škerget, Mojca & Knez, Željko & Weinreich, Bernd & Otto, F & Grüner-Lempart, Sabine. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*. 96. 597-605. 10.1016/j.foodchem.2005.03.015.
- Pervin, M., Unno, K., Ohishi, T., Tanabe, H., Miyoshi, N., & Nakamura, Y. (2018). Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(6), 1297. doi:10.3390/molecules23061297

- Phung O.J., Baker W.L., Matthews L.J., Lanosa M., Thorne A. & Coleman C.I. (2010). Effect of green tea catechins with or without caffeine on anthropometric measures: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 91(1):73-81.
- Powell, N. (2015). Antioxidant Activity of Green Tea Catechins. Food and Beverage Consumption and Health. Antioxidant Properties, Consumption and Role in Disease Prevention. Editorial Nova. New York.
- Prat, L., & Ramos, J. (2009). *El Libro del Té*. Barcelona: Integral.
- Prieto, F., & Báez, O. A. (2011). Concentraciones de arsénico en agua potable y sus implicaciones de bioacumulación y teratogénesis en el pez cebra (*Danio rerio*). *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 2(1), 37-50.
- Re, R., Pellegrinia N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9–10): 1231-1237.
- Reygaert W. C. (2018). Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *BioMed research international*, 2018, 9105261. doi:10.1155/2018/9105261.
- Robbins, L.S., Cotran, S.R. & Kumar, V. (1987). *Patología Estructural y Funcional*. 3a ed. México: Interamericana.
- Rodríguez-Estrada, J., Sobrino-Figueroa, A. S., & Martínez-Jerónimo, F. (2015). Acute toxicity and sublethal effects on macromolecules concentration, caloric content, and lipid peroxidation during exogenous-feeding of *Danio rerio* larvae exposed to Cu²⁺. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(4), 397-404.
- Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A., & Del Mar Contreras, M. (2019). Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(8), 1212-1229.
- Rojas-Muñoz A., Bernard A & Izpisúa J.C., (2007). *El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina*. Investigación y ciencia, núm. 366: 66-69.

- Ruch, R. J., Cheng, S. J., & Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008.
- Sabu, Mc., Thambi, P., Ramadasan, K., & Ikuo, N. (2010). Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine*. 5. 10.1186/1749-8546-5-13.
- Saklar, S., Ertas, E., Ozdemir, I. S., & Karadeniz, B. (2015). Effects of different brewing conditions on catechin content and sensory acceptance in Turkish green tea infusions. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6639–6646. doi:10.1007/s13197-015-1746-y
- Sánchez, M., Santiago, E., Vargas, L., & Mendoza, V. (2004). Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica A.C.*, 29(3), 81-90.
- Sandrini, J. Z., Bianchini, A., Trindade, G. S., Nery, L. E. M., & Marins, L. F. F. (2009). Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquatic toxicology*, 95(4), 285-291.
- Scotto, C., Arrilucea, M., Vargas, G., Salas, J., & Ybañez, J. (2017). Implementación de una metodología toxicológica para la rápida determinación del CL50 del sulfato de cobre en peces Cebra (*Danio rerio*) a 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición. *Cátedra Villarreal*, 4(2).
- Senanayake, N. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications. A review. *Journal of Functional Foods*.
- Session, S. S. (2018). Committee on Commodity Problems. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.

- Sotero, V. E., Silva, L., Merino-Zegarra, C., Maco, M., Dávila, E., Ramírez, W., & García, D. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante de seis frutales amazónicos: anona, castaña, chope, huasaí, huito y uvilla. *Folia Amazónica*, 20(1-2), 53-58.
- Stohs, S. J., Swaroop, A., Moriyama, H., Bagchi, M., & Ahmad, T. (2018). A Review on Antioxidant, Anti-Inflammatory and Gastroprotective Abilities of Mango (*Mangifera indica*) Leaf Extract and Mangiferin. *J Nutr Health Sci*, 5(3), 303-317.
- Vargas-Vargas, Rafael Antonio. (2017). Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia en México*, 29(Supl. 1), 86-96. Recuperado en 13 de noviembre de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-87712017000400086&lng=es&tlng=es.
- Veciana, C.; Torro, L.; Sirvent, E.; Palazón-Bru, A.; Rizo-Baeza, M.M.; Gil-Guillén, F.V. & Cortés-Castell. (2016). Ausencia de efecto antiadipogénico en pez cebra de los polifenoles de extracto de hueso de aceituna. *Journal of Negative and no positive results*. 1(4). 138–141.
- Westerfield, M. (1995). The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachy danio rerio*). University of Oregon Press, Eugene, OR.
- Wolfram S., Wang Y. & Thielecke F. (2006) Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol.Nutr. FoodRes*.50(2):176-87.
- Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., & Wang, X. (2012). Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere*, 88(4), 377-383.
- Yamaguchi, N., Mahbub, M. H., Takahashi, H., Hase, R., Ishimaru, Y., Sunagawa, H., Amano, H., Kobayashi, M., Kanda, H., Fujita, Y., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Kikuchi, S., Ikeda, A., Takasu, M., Kageyama, N., Nakamura, M., & Tanabe, T. (2017). Plasma free amino acid profiles evaluate risk of metabolic syndrome, diabetes, dyslipidemia, and hypertension in a large Asian population. *Environmental health and preventive medicine*, 22(1), 35.

CAPÍTULO 8: ANEXOS

“Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad”

CONSTANCIA N°433-USM-2019

LA JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta estéril), recibida de **María Elena Rodrigo Rojas**; de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Camellia sinensis*** (L.) Kuntze y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: THEALES

FAMILIA: THEACEAE

GENERO: *Camellia*

ESPECIE: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze

Nombre vulgar: “Te verde”

Determinado por: Mg. Hamilton Wilmer Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 03 de diciembre de 2019




Dra. Mónica Arakaki Makishi
JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

MAM/ddb